

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Inneren Klinik (Tumorforschung)

Identifizierung von Gensignaturen als Prognosefaktoren unter
multimodaler Therapie von Patienten mit einem
Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom im Stadium III

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Joana Victória Spiekermann
aus Frankfurt am Main
2015

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. A. C. Hoffmann
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. B. Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 2016

Ein Teil der Ergebnisse dieser Dissertation wurde im Rahmen des Vortrags „**Translational research in stage III non-small-cell lung cancer**“, am 18.11.2011 bei dem “9th Congress on Lung Cancer” (Grupo Español de Cancer de Pulmón, Spanish Lung Cancer Group (SLCG)) in Barcelona, Spanien, vorgestellt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	7
1.1 Epidemiologie.....	7
1.2 Ursachen und Risikofaktoren	7
1.3 Diagnose.....	8
1.4 Therapie	12
1.5 Biomarker.....	13
1.6 DNA-Reparatur und die Gene BRCA1, RAP80 und 53BP1.....	14
1.6.1 Homologe Rekombination	17
1.6.2 Nukleotidexzisionsreparatur	17
1.7 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Patienten und Therapie.....	19
2.1.1 ESPATÜ-Studienpatienten.....	19
2.1.2 Nicht-ESPATÜ-Patienten	26
2.2 Statistische Analyse.....	27
2.3 Molekulare Analysen.....	28
2.3.1 Mikrotomie.....	28
2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
2.3.3 Bewertung durch den Pathologen	29
2.3.4 Mikrodissektion.....	29
2.3.5 Makrodissektion.....	33
2.3.6 mRNA-Expressionsanalyse	33
2.3.6.1 mRNA-Extraktion.....	33
2.3.6.2 Reverse Transkription	34
2.3.6.3 Real-Time PCR und Quantifizierung der Genexpression.....	35
2.3.6.4 Entwurf und Qualitätskontrollen der genspezifischen Primer und Sonden	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Patient-Flow (Consort-Diagramm)	38
3.2 Patientencharakteristik.....	40
3.3 Analyse der BRCA1-mRNA-Expression	42
3.3.1 Unterschied zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen.....	42
3.3.2 Unterschied zwischen beiden Geschlechtern	45

3.3.3	Unterschied des OS zwischen Patienten mit niedriger und hoher Expression	45
3.3.4	Unterschied des PFS zwischen Patienten mit niedriger und hoher Expression	47
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur BRCA1-mRNA-Expression	49
3.4	Analyse der 53BP1-mRNA-Expression	49
3.4.1	Unterschied zwischen den Geschlechtern	49
3.4.2	Unterschied zwischen Patienten höheren und geringeren Alters	50
3.4.3	Unterschied des OS zwischen niedrig- und hochexprimierenden ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen	50
3.4.4	Unterschied des PFS zwischen niedrig- und hochexprimierenden ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen	51
3.4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur 53BP1-mRNA-Expression	52
3.5	Analyse der RAP80-mRNA-Expression	53
3.5.1	Unterschied zwischen beiden Geschlechtern	53
3.5.2	Unterschied des PFS zwischen niedrig- und hochexprimierenden ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen	54
3.5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur RAP80-mRNA-Expression	55
3.6	Gensignatur BRCA1 und RAP80	55
3.6.1	Unterschied des OS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten	55
3.6.2	Unterschied des PFS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten	57
3.6.3	Zusammenfassung zur Gensignatur BRCA1 und RAP80	60
3.7	Gensignatur BRCA1 und 53BP1	60
3.7.1	Unterschied des OS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten	61
3.7.2	Unterschied des PFS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten	63
3.7.3	Zusammenfassung zur Gensignatur BRCA1 und 53BP1	64
3.8	Korrelation der histologischen Tumorentität mit dem Outcome	65
3.8.1	Gesamtkollektiv	65
3.8.2	ESPATÜ-Studienpatienten	66
4	Diskussion	69
4.1	Vergleich histologischer Subgruppen	70
4.2	BRCA1	70
4.3	53BP1	73
4.4	RAP80	73
4.5	RAP80- und BRCA1-Expression	74
4.6	53BP1- und BRCA1-Expression	75
4.7	ESPATÜ-Patienten versus Gesamtgruppe	76

4.8	Methodenkritik	76
4.8.1	Ungenauigkeiten von Genexpressionsanalysen.....	76
4.8.2	mRNA-Expression versus Protein-Expression	77
5	Zusammenfassung.....	78
	Literaturverzeichnis.....	79
	Anhang	89
	Weitere Ergebnisse	89
	Abkürzungsverzeichnis.....	90
	Danksagung.....	93
	Lebenslauf	94

1 Einleitung

Bei der Behandlung des metastasierten oder rezidierten Lungenkarzinoms kommen inzwischen, durch die Identifizierung individueller genetischer Veränderungen wie beispielsweise der EGFR-Mutationen, biologische Agenzien gezielt und mit hoher Effektivität zum Einsatz (Köhler et al., 2013; Mok et al., 2009). Ein Großteil der Patienten wird jedoch weiterhin mit Platin-basierter Kombinationschemotherapie behandelt (Schrump et al., 2011). Für die Anwendung von Platinderivaten fehlen bisher verlässliche, klinisch validierte prädiktive Marker für das Ansprechen sowohl auf die systemische Therapie als auch auf eine multimodale Behandlung unter Einschluss einer Platin-haltigen Kombination in der simultanen Chemostrahlentherapie (Eberhardt et al., 2015; Gautschi et al., 2010). Somit stellt die Identifikation von Biomarkern für den individuellen Einsatz von zytotoxischer Therapie einen wichtigen Forschungsansatz dar.

1.1 Epidemiologie

Weltweit wurde im Jahr 2012 bei 1,8 Millionen Menschen die Diagnose eines Lungenkarzinoms gestellt (Torre et al., 2015). Das Lungenkarzinom stellt bei Männern (weltweit) und bei Frauen (in Industrienationen) die häufigste krebsbedingte Todesursache dar (Islami et al., 2015; Torre et al., 2015). Lungenkrebs war 2004 die zweithäufigste Ursache für Krebs-Neuerkrankungen (häufigste Ursache bei Männern war das Prostatakarzinom, bei Frauen das Mammakarzinom) (Schottenfeld, 2010). Im Jahr 2012 traten in den USA etwa 226.160 Neuerkrankungen und 160.340 Lungenkarzinom-bedingte Todesfälle auf (Siegel et al., 2012). Im Jahr 2011 traten in Deutschland etwa 52.717 Neuerkrankungen und 43.944 Sterbefälle auf (Kaatsch et al., 2013). Vor allem in Europa, Nordamerika und Ostasien ist die Inzidenzrate weiterhin ansteigend und hoch.

1.2 Ursachen und Risikofaktoren

Den stärksten Risikofaktor stellt das aktive Rauchen dar, welches für mehr als 85% aller Lungenkrebsfälle verantwortlich gemacht wird (Burns et al., 2011). Dabei sind die Dauer des Rauchens und die kumulative Anzahl von gerauchten Zigaretten die wichtigsten Einflussfaktoren (IARC, 2004). Auch das passive Rauchen erhöht das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken und ist für 20% bis 50% der Lungenkarzinome bei Nicht-Rauchern verantwortlich (Schrump et al., 2011).

Der zweitwichtigste exogene Risikofaktor ist die Exposition gegenüber dem natürlich vorkommenden Edelgas Radon, welches in Gesteinen und Böden nach radioaktivem Zerfall von Uran entsteht (Darby et al., 2005).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über weitere nachgewiesene Risikofaktoren:

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms

Radioaktive Strahlung (insbesondere iatrogen in der Röntgendiagnostik) (Boffetta et al., 2005)
Luftverschmutzung durch Mikropartikel (Hamra et al., 2014)
Dieselmotoremissionen (Wichmann, 2007)
Berufliche Exposition gegenüber Asbest, künstlichen Mineralfasern, Chrom VI-Verbindungen, Arsen, Haloether, Nickel, Quarzstaub und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Benzo[a]pyren) (Goeckenjan et al., 2010)
Lungenemphyseme, chronische Bronchitiden, Pneumonien und Tuberkulose (unabhängig vom Raucherstatus) (Brenner et al., 2012)
Genetische Prädisposition, zum Beispiel Keimbahnmutationen im EGFR-Gen (Gazdar et al., 2014)

Protektive Faktoren scheinen körperliche Bewegung in der Freizeit (Tardon et al., 2005) und der Verzehr von Obst und Gemüse zu sein (Lam et al., 2009; Neuhauser et al., 2003).

1.3 Diagnose

Die Weltgesundheitsorganisation („World Health Organization“, WHO) unterteilt das Lungenkarzinom in zwei große Gruppen: Die kleinzelligen („small cell lung cancer“, SCLC) und die nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome („non-small cell lung cancer“, NSCLC) (Travis, 2011). Die SCLC machen etwa 15%, die NSCLC etwa 85% aller Lungenkarzinome aus. Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom lässt sich histologisch weiter in drei Haupttypen einteilen: Das Plattenepithelkarzinom (circa 20-30%), welches vorwiegend zentral lokalisiert ist, das Adenokarzinom (circa 35-45%), das sich oft peripher befindet und die häufigste Krebsform bei Nichtrauchern darstellt, und das großzellige Lungenkarzinom (circa 3-10%) (Travis, 2011). Es gibt

vier Stadien dieser Erkrankung. Die Klassifikation erfolgt gemäß der aktuellen TNM-Stadieneinteilung nach IASLC („International Association for the Study of Lung Cancer“) und UICC7 („Union internationale contre le cancer“) (Goldstraw et al., 2007), siehe Tabelle 2 und Tabelle 3. Im Stadium IIIA N2 erfolgt zusätzlich die Unterteilung nach Robinson (Robinson et al., 2007), siehe Tabelle 4.

Tabelle 2: TNM Stadien nach IASLC Lung Cancer Staging Project (Goeckenjan et al., 2010; Goldstraw et al., 2007)

Kategorie	Stadium	Kurzbeschreibung
T (Tumor)	Tis	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma in situ
	T1 <ul style="list-style-type: none"> • T1a • T1b 	<ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser < 3cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt <ul style="list-style-type: none"> ○ größter Durchmesser < 2cm ○ größter Durchmesser > 2 < 3 cm
	T2 <ul style="list-style-type: none"> • T2a • T2b 	<ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 3 < 7 cm oder • Infiltration des Hauptbronchus oder • Infiltration der viszeralen Pleura oder • tumorbedingte partielle Atelektase <ul style="list-style-type: none"> ○ größter Durchmesser > 3 < 5 cm ○ größter Durchmesser > 5 < 7 cm
	T3	<ul style="list-style-type: none"> • größter Durchmesser > 7 cm oder • Infiltration von Zwerchfell, N. phrenicus, mediastinaler Pleura oder parietalem Perikard • Tumor im Hauptbronchus < 2 cm distal der Karina, aber ohne Beteiligung der Karina • Tumor-assoziierte komplette Atelektase oder obstruktive Pneumonie • zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen
	T4	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor jeder Größe mit Infiltration von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Karina • zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen
N (Lymphknoten)	N0	<ul style="list-style-type: none"> • keine Lymphknotenmetastasen

	N1	<ul style="list-style-type: none"> Metastase in ipsilateralen, peribronchialen und / oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und / oder intrapulmonalen Lymphknoten
	N2	<ul style="list-style-type: none"> Metastase in ipsilateralen mediastinalen und / oder subkarinalen Lymphknoten
	N3	<ul style="list-style-type: none"> Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateral tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten
M (Metastase)	M0	<ul style="list-style-type: none"> keine Fernmetastasen
	M1 <ul style="list-style-type: none"> M1a M1b 	<ul style="list-style-type: none"> Metastasen <ul style="list-style-type: none"> separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen Pleura mit knotigem Befall maligner Pleuraerguss maligner Perikarderguss Fernmetastasen

Tabelle 3: Klassifikation der Tumorstadien nach IASLC/UICC 7 (Goeckenjan et al., 2010; Goldstraw et al., 2007)

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
IA	T1a/b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b T1a/b T2a	N0 N1 N1	M0 M0 M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a/b T2 a/b T3 T4	N2 N2 N1/2 N0/1	M0 M0 M0 M0
IIIB	T4 jedes T	N2 N3	M0 M0
IV	jedes T jedes T	jedes N jedes N	M1a M1b

Tabelle 4: Subklassifikation des Stadiums IIIA(N2) (Robinson et al., 2007)

Stadium	Beschreibung
IIIA ₁	inzidentelle Lymphknotenmetastasen nach postoperativer Aufarbeitung im Präparat
IIIA ₂	intraoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer Lymphknotenstation
IIIA ₃ *	präoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer oder mehreren Lymphknotenstationen (PET, Mediastinoskopie, Biopsie)
IIIA ₄	ausgedehnte („bulky“) oder fixierte N2-Metastasen oder Metastasen in mehreren Lymphknotenstationen (mediastinale Lymphknoten > 2 - 3 cm) mit extrakapsulärer Infiltration; Befall mehrerer N2-Lymphknotenpositionen; Gruppen multipler befallener kleinerer (1 - 2 cm) Lymphknoten

*klinisch ist in diesem Stadium eine weitere Unterteilung in unilevel (U) und multilevel (M) sinnvoll

In frühen Stadien ist das Lungenkarzinom meist asymptomatisch. Husten, Gewichtsverlust, Dyspnoe und Thoraxschmerzen sind oft bereits Zeichen eines fortgeschrittenen Tumorleidens. Lokale tumorbedingte Symptome können zusätzlich Hämoptysen, Atelektasen, eine obere Einflussstauung (Vena-cava-superior-Syndrom), Dysphagie, Stridor, Heiserkeit (Lähmung des N. recurrens), eine Armschwäche und ein Horner-Syndrom (Infiltration des Ganglion stellatum) sein (Schrump et al., 2011). Durch Metastasierung in die kontralaterale Lunge, in die Knochen, die Leber, Nebenniere, Lymphknoten und das zentrale Nervensystem kommt es gegebenenfalls zu Knochenschmerzen, neurologischen Störungen, Übelkeit, Lymphknotenschwellungen und Ikterus. Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust, Asthenie und Trommelschlegelfinger sind eher beim NSCLC zu beobachten. Paraneoplastische Syndrome wie zum Beispiel das Syndrom der inadäquaten ADH-Ausschüttung (SIADH), Cushing-Syndrom oder paraneoplastische neurologische Störungen (z.B. Lambert-Eaton-Syndrom) kommen häufiger beim SCLC vor (Masters, 2010).

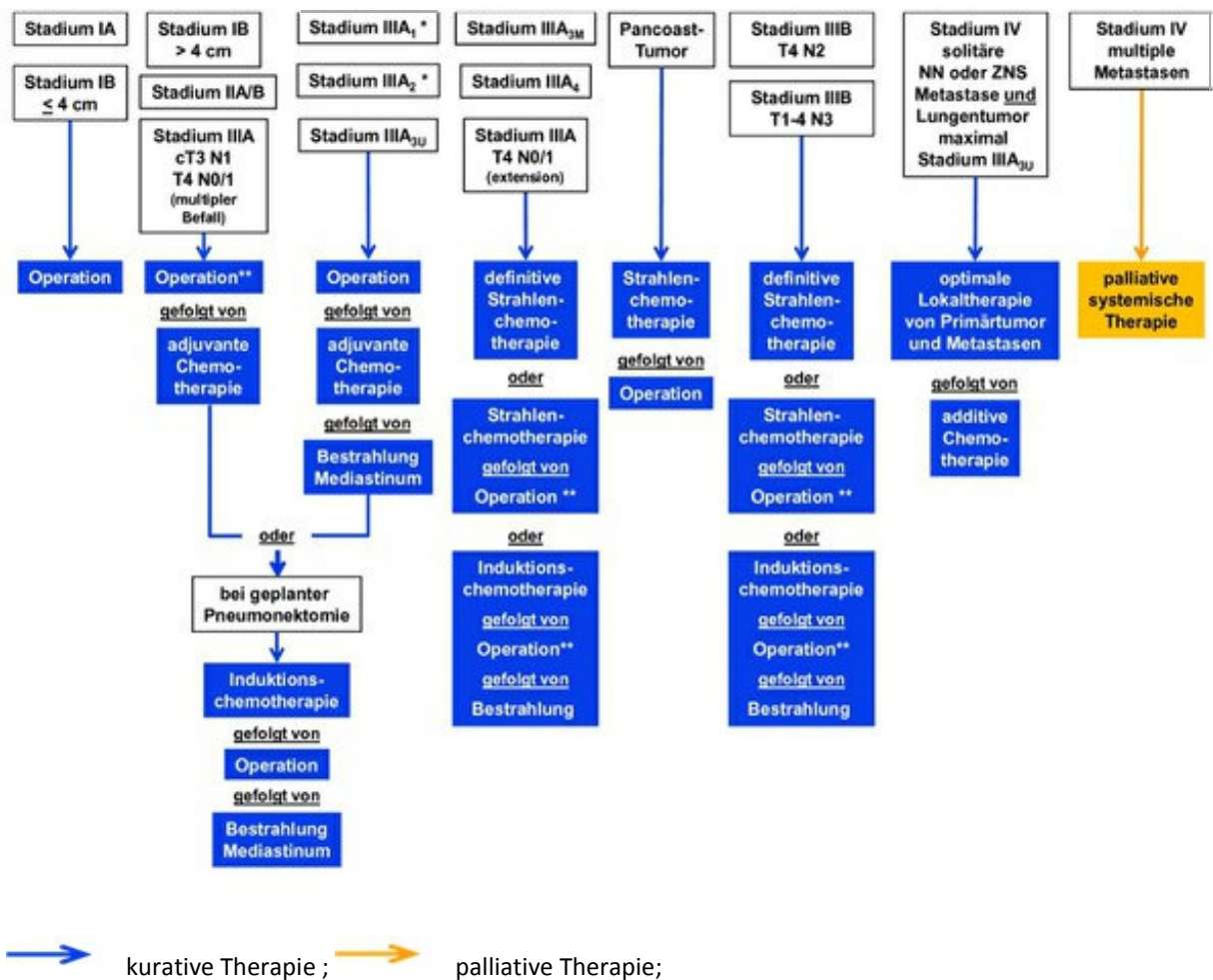
Zur Diagnosestellung werden Laboruntersuchungen, Röntgen-Thorax-Untersuchung in zwei Ebenen, eine Computertomographie des Thorax und des Oberbauchs mit intravenöser Kontrastmittelgabe und die histopathologische Bestätigung im Rahmen einer Biopsie des Primärtumors oder von Tumorherden außerhalb des Primärtumors verwendet (Goeckenjan et al., 2010). In der Ausbreitungsdiagnostik („Staging“) werden fehlende Untersuchungen nachgeholt wie beispielsweise ein Schädel-CT oder Schädel-MRT, gegebenenfalls eine Positronenemissionstomographie mit Computertomographie (PET-CT) zur Festlegung des Therapiekonzepts sowie endobronchialer oder endoösophagealer Ultraschall mit Feinnadelbiopsie (alternativ Mediastinoskopie).

1.4 Therapie

Die Primärtherapie des Lungenkarzinoms wird unter Berücksichtigung der Komorbiditäten des Patienten und seines Allgemeinzustandes von der klinischen Stadieneinteilung abhängig gemacht. Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 1 auf der Seite 13 dargestellt (Goeckenjan et al., 2010). Da es sich bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Stadium III um eine klinisch sehr heterogene Gruppe handelt, muss die Behandlung individuell adaptiert werden. Hierbei spielt ein multimodales Therapiekonzept mit Einbezug von Chemo-, Radiotherapie und Operation eine wichtige Rolle. Das Vorgehen sollte im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz für den individuellen Patienten besprochen und konsentiert werden (Eberhardt et al., 2015; Goeckenjan et al., 2010).

Wenn, trotz der mediastinalen Ausbreitungsdiagnostik, eine N2-Situation erst intraoperativ festgestellt wird, wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Eine postoperative Bestrahlung ist im Falle einer R0-Resektion nur bei N2-Befall im Resektat individuell zu diskutieren. Wird nach invasivem mediastinalem Staging (Mediastinoskopie oder Feinnadelbiopsie gesteuert durch endobronchialen Ultraschall) ein N2 Stadium (IIIA) festgestellt, dann sollte der Tumor multimodal therapiert werden. In diesem Fall stehen mehrere Therapieoptionen zur Verfügung: Induktions-Chemotherapie oder Induktions-Radiochemotherapie gefolgt von der Operation, sowie eine simultane definitive Radiochemotherapie. Auch bei potentiell operablen IIIA-Stadien und einzelnen Patienten mit NSCLC im Stadium IIIB mit erhöhtem Risiko einer inkompletten Resektion (R1- oder R2-Resektion) kann eine simultane Induktions-Radiochemotherapie (gefolgt von der Operation) durchgeführt werden. Patienten mit inoperablen Karzinomen des Stadiums III erhalten eine simultane Radiochemotherapie (alternativ eine Induktions-Chemotherapie gefolgt von einer definitiven Radiotherapie). Es hat sich eine Platin-basierte Chemotherapie in Kombination mit Etoposid oder einem Vinka-Alkaloid (Vinorelbin) bewährt. (Eberhardt et al., 2015)

Abbildung 1: Algorithmus für die Primärtherapie des Bronchialkarzinoms (Goeckenjan et al., 2010)



* klinische Stadien

** individuelle Konzepte bei den Stadien IIIA cT3N1 und T4N0/1 in Abhängigkeit von den benachbarten, infiltrierten Strukturen (z. B. Wirbelkörper, Mediastinum, große Gefäße)

1.5 Biomarker

Ein Biomarker wird definiert als „objektive Messgröße zur Bewertung von normalen biologischen Prozessen, von pathologischen Prozessen, von pharmakologischen Reaktionen auf eine therapeutische Intervention oder von Reaktionen auf präventive oder andere Gesundheitsinterventionen“ (Hüsing et al., 2008). Im optimalen Falle können Biomarker zur Vorhersage der Ansprechenswahrscheinlichkeit, der Prognoseabschätzung und möglicherweise zum Therapie-Monitoring eingesetzt werden (Hüsing et al., 2008). Die Standardchemotherapie des NSCLC basiert auf platinhaltigen Kombinationen. Es konnten bereits Zusammenhänge zwischen Genmutationen oder quantitativen Expressionsveränderungen verschiedener DNA-

Reparatur-Gene und dem Ansprechen auf die Therapie hergestellt werden (Bonanno et al., 2013; Ceppi et al., 2010; Karachaliou et al., 2013; Rosell et al., 2003). Auf der Basis dieser Korrelationen könnten möglicherweise Biomarker identifiziert werden, die eine für den einzelnen Patienten bedarfsgerechtere und angemessenere Therapieentscheidung erlauben (Morales-Espinosa et al., 2015).

1.6 DNA-Reparatur und die Gene BRCA1, RAP80 und 53BP1

Um genomische Stabilität zu gewährleisten ist eine angemessene Antwort der Zelle auf DNA-Schädigung unentbehrlich. Insbesondere Doppelstrangbrüche („double-strand breaks“, DSB) stellen eine Gefahr für die Zelle dar. Sie können sowohl exogene (ionisierende Strahlung und DNA-quervernetzende Wirkstoffe) als auch endogene (abgerissene Replikationsgabeln, Nukleasen und oxidativer Stress mit Bildung reaktiver Sauerstoffspezies) Ursachen haben (Bekker-Jensen et al., 2010; Bonanno et al., 2014; Shi et al., 2012). Beim Auftreten eines solchen Bruches der DNA-Doppelhelix wird eine komplexe Signalkaskade in Gang gesetzt, die sogenannte „DNA damage response“ (DDR), deren Ziel es ist, die Kontinuität der Nukleinsäure wiederherzustellen und somit die Integrität der genetischen Information zu erhalten (Bekker-Jensen et al., 2010).

Doppelstrangbrüche werden hauptsächlich durch zwei Stoffwechselwege repariert: die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung („nonhomologous end-joining“, NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR) (Bekker-Jensen et al., 2010; Bonanno et al., 2014; Shi et al., 2012).

Bei der NHEJ ligiert ein Multiprotein-Komplex meist unter Verlust von einigen Nukleotiden beide Enden direkt. Dieser Prozess ist fehleranfällig (Bekker-Jensen et al., 2010). Die Reparatur von DSB durch Homologe Rekombination beruht auf dem Austausch genetischer Information zwischen zwei identischen DNA-Molekülen, den Schwesterchromatiden (Shi et al., 2012). Die homologe Chromatide dient als Vorlage für das Wiederherstellen der Sequenz der geschädigten DNA (Shi et al., 2012). Der Strangbruch kann somit fehlerfrei repariert werden.

An der „DNA damage response“ sind viele Proteine beteiligt, dessen Wechselspiel noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist. Die Signalkaskade bildet mikroskopisch sichtbare Foci, die sogenannten „ionizing radiation-induced foci“ (IRIF) (Bekker-Jensen et al., 2010). Sie wird in der Literatur zum Teil folgendermaßen beschrieben:

1. Der MRE11-RAD50-NBS1- (**MRN**-) Komplex erkennt und bindet den DSB (Bekker-Jensen et al., 2010; Guzzo et al., 2012; Shi et al., 2012; Uziel et al., 2003)
2. Rekrutierung von Ataxia Teleangiectasia Mutated (**ATM**), einer wichtigen Kinase in der DDR (Guzzo et al., 2012; Shi et al., 2012; Uziel et al., 2003). Sie phosphoryliert die Histon-Variante H2AX und erzeugt somit eine Bindungsstelle hoher Affinität für MDC1 (Bekker-Jensen et al., 2010; Shi et al., 2012; Sobhian et al., 2007).
3. Rekrutierung von Mediator of DNA damage Checkpoint 1 (**MDC1**). Dieses Enzym rekrutiert unter anderem weitere MRN-Komplexe, die E3 Ubiquitin Ligasen **RNF8** und **RNF168** (Bekker-Jensen et al., 2010; Strauss et al., 2011) und die E2 Ubiquitin Ligase **UBC13**. (Strauss et al., 2011).
4. Ubiquitilierung von Histon H2A und H2AX durch RNF8 und RNF168 (Guzzo et al., 2012; Shi et al., 2012).
5. Bindung des Ubiquitin-Interaktions-Motiv enthaltenden **Receptor Associated Protein 80 (RAP80; UIMC1)** an ubiquitilierte Histone (Shi et al., 2012), ubiquitiliertes MDC1 (Sobhian et al., 2007; Strauss et al., 2011) und an SUMO-Ubiquitin-Hybride (Guzzo et al., 2012)
6. Rekrutierung von E3 Ubiquitin Ligase **Breast Cancer 1(BRCA1)** und **tumor protein p53 binding protein 1 (53BP1)** (Strauss et al., 2011). Dabei mediiert RAP80 die Bindung von BRCA1 (Bekker-Jensen et al., 2010; Guzzo et al., 2012; Shi et al., 2012). 53BP1 wird durch MDC1 unabhängig von RAP80 rekrutiert (Strauss et al., 2011).

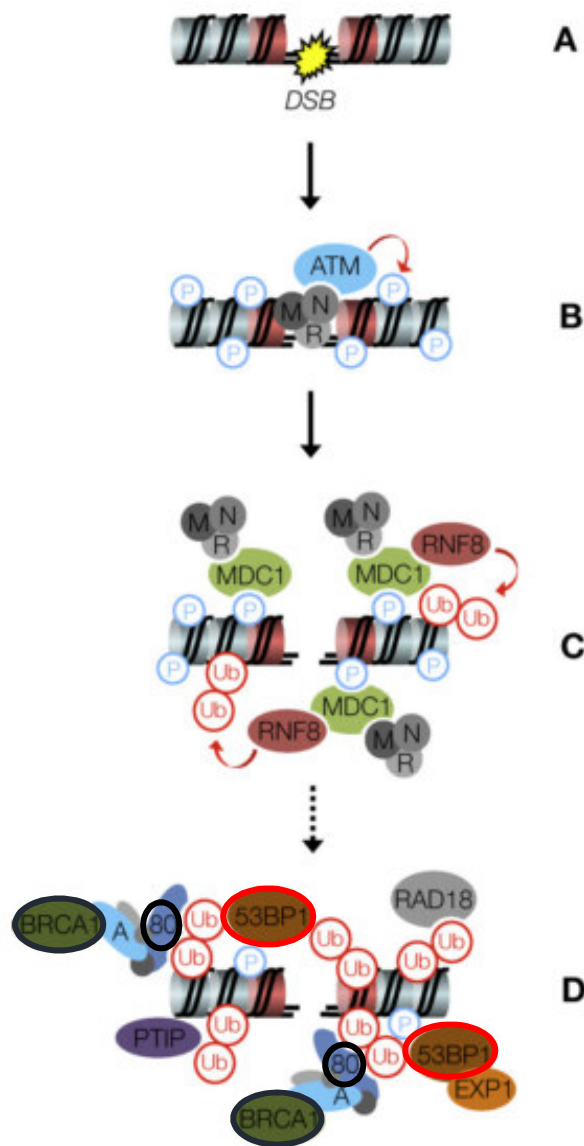


Abbildung 2: Bildung der IRIF. Doppelstrangbrüche (A) werden vom MRN (MRE11-RAD50-NBS1)-Komplex erkannt. Dieser rekrutiert die ATM-Kinase. ATM phosphoryliert die Histon-Variante H2AX (B). MDC1 und seine Bindungspartner (u.a. weitere MRN-Komplexe und RNF8) docken an (C). RNF8 ubiquityliert die Histon-Varianten H2A und H2AX. Diese Chromatinveränderung führt zur Rekrutierung anderer Reparaturfaktoren, u.a. 53BP1 und RAP80. RAP80 mediiert die Bindung von BRCA1 an die IRIF (D). P: Phosphat, M: MRE11, N: NBS1, R: RAD50, Ub: Ubiquitin, A: Abraxas (ABRA1), 80: RAP80, EXP1: EXPAND1. (modifiziert nach Bekker-Jensen et al., 2010)

Ob die Reparatur des Doppelstrangbruchs über HR oder NHEJ erfolgt, hängt von den Proteinen ab, die im Laufe der DDR rekrutiert werden und Überhand gewinnen. Während RAP80 und BRCA1 die Weichen für die Homologe Rekombination stellen, spielt 53BP1 eine wichtige Rolle bei der Nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung (Bekker-Jensen et al., 2010; Daley et al., 2014; Hu et al., 2011; Kakarougkas et al., 2014; Panier et al., 2014; Shi et al., 2012; Strauss et al., 2011). RAP80 wirkt als Inhibitor der BRCA1-abhängigen Homologen Rekombination: Es beugt einem

Hyperrekombinations-Phänotyp vor, welches genauso wie eine zu niedrige HR-Aktivität, zum Anhäufen von DSB, zu chromosomalen Rearrangements und genetischer Instabilität führt (Hu et al., 2011). Wahrscheinlich hemmt RAP80 eine übermäßige 5'-Resektion am DSB (Coleman et al., 2011). 53BP1 blockiert die Resektion der 5'-Enden am DSB und hemmt somit völlig die HR (Bunting et al., 2010; Hu et al., 2011). BRCA1 fördert vermutlich die Entfernung von 53BP1, um die 5'-End-Resektion zuzulassen (Bunting et al., 2010). Somit wirken diese beiden Proteine antagonistisch. Bei BRCA1-Mangel oder -Defizienz kommt es vermehrt zur DSB-Reparatur mittels NHEJ und folglich zu einem höher mutagenen Outcome (Daley et al., 2014).

1.6.1 Homologe Rekombination

Nachdem der DSB durch den MRN-Komplex erkannt und gebunden wird (Bekker-Jensen et al., 2010), schneidet eine Exonuklease die 5'-Enden des gebrochenen DNA-Moleküls ab und stellt einzelsträngige 3'-Enden her (Bekker-Jensen et al., 2010). Dies wird durch BRCA1 gefördert (Hu et al., 2011). „Partner and localizer of BRCA2“ (**PALB2**) bindet an BRCA1 und rekrutiert **BRCA2** und **RAD51** (Sy et al., 2009). PALB2 ist ein Adapterprotein zwischen BRCA1 und BRCA2 (Sy et al., 2009). RAD51 windet sich um den 3'-Einzelstrang und stabilisiert diesen (Yu et al., 2001). Dieser Einzelstrang dringt nun unter dem Einfluss von RAD51 in die Schwesterchromatide ein und geht mit der intakten DNA-Matrize Basenpaarungen ein (Bugreev et al., 2007; Ceballos et al., 2011; Schrupp et al., 2011). Eine Polymerase verlängert das 3'-Ende des gebrochenen Chromosoms an der komplementären DNA-Sequenz und stellt so die verlorene Information wieder her (Bugreev et al., 2007). Zuletzt dissoziieren beide DNA-Moleküle und die Lücke des ursprünglich geschädigten Strangs wird an der neusynthetisierten Nukleinsäure gefüllt (Bugreev et al., 2007; Ceballos et al., 2011).

1.6.2 Nukleotidexzisionsreparatur

Platinhaltige Zytostatika schädigen die DNA, indem es zu einer kovalenten Bindung zwischen dem Platinatom und zwei Nukleinbasen kommt (DNA-Addukte) (Bonanno et al., 2014). Es kommt zu Quervernetzungen der DNA (Noll et al., 2006). Sie hemmen die Replikation und die Transkription und führen zu DNA-Doppelstrangbrüchen oder zum Einleiten der Apoptose (Kelland, 2007; Oliver et al., 2010). Die Sensitivität oder Resistenz der Lungenkarzinom-Zelle gegenüber Cisplatin hängt von der Fähigkeit ab, solch einen DNA-Schaden zu beseitigen (Oliver et al., 2010). Der führende Reparaturmechanismus von Platin-Addukten ist die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Nel et al., 2013; Oliver et al., 2010). BRCA1 spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung des DNA-Schadens, dem folgenden Zellzyklusarrest und der Regulation der Reparatur. Es wirkt als Transkriptionsaktivator für die notwendigen Proteine (Hartman et al., 2002).

1.7 Ziel der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit wurde Tumorgewebe von insgesamt 100 Patienten mit einem NSCLC im Stadium IIIA und einzelnen Patienten mit Stadium IIIB, die im Rahmen eines multimodalen Therapieprotokolls im Westdeutschen Tumorzentrum Essen behandelt worden sind, auf die vorliegende Höhe der Expression dreier DNA-Reparaturgene (RAP80, BRCA1 und 53BP1) hin analysiert. Das Tumorgewebe wurde präferentiell aus mediastinalen Lymphknoten gewonnen, welche im Rahmen der Staging-Mediastinoskopie entnommen wurden. Ziel der Arbeit war die Analyse der Expressionshöhe der genannten Gene und die Korrelation dieser mit klinischen Parametern wie den Endpunkten Gesamtüberleben und Progressions-freiem Überleben.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Therapie

In unserer Arbeit wurden Patienten der ESPATÜ-Studie eingeschlossen sowie Patienten aufgenommen, die formal die Studieneinschlusskriterien erfüllten, aus unterschiedlichen Gründen aber nicht innerhalb der Studie behandelt werden konnten.

2.1.1 ESPATÜ-Studienpatienten

Die ESPATÜ-Studie ist eine prospektive randomisierte Phase III Studie zur multimodalen Behandlung des Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinoms im lokal fortgeschrittenen Stadium III. In die Studie wurden volljährige Patienten mit einem histologisch gesicherten, operablen NSCLC im Stadium IIIA (N2) oder selektive IIIB Patienten ohne Kontraindikationen für ein kurativ beabsichtigtes Behandlungsprotokoll aufgenommen. Die Einschluss- und Ausschlusskriterien sowie die gewählten Subgruppen des Stadiums IIIA und IIIB sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Ein- und Ausschlusskriterien für die ESPATÜ-Studie (Eberhardt et al., 2015)

Einschlusskriterien:

- Alter ≥ 18 Jahre und < 75 Jahre
- Frauen (und Männer) müssen für eine effektive Antikonception sorgen
- Histologisch nachgewiesenes lokal fortgeschrittenes Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom der Stadien IIIA oder IIIB (eingeschlossene Subgruppen siehe unten)
- Allgemeinzustand ECOG 0 oder 1
- Funktionelle und medizinische Operabilität (FEV1 nach der Radiotherapie wird auf > 1 Liter geschätzt, keine größeren Komorbiditäten, radikale Bestrahlbarkeit) und hinreichender Allgemeinzustand für eine intensive multimodale Therapie
- Kreatinin und Bilirubin im Serum $\leq 1,5$ mg/dl
- Neutrophile Granulozyten $\geq 1500/\text{mm}^3$, Thrombozyten $\geq 100.000/\text{mm}^3$, Hämoglobin $\geq 10,0$ g/dl
- Adäquate hepatische und renale Organfunktionen
- Stabile kardiale Funktion (kein Myokardinfarkt in den letzten 6 Monaten, keine Herzinsuffizienz NYHA III-IV)
- Schriftliche Einwilligung in die klinische Phase III-Studie.

Fortsetzung Tabelle 5

Ausschlusskriterien:

- Operables Stadium IIB oder IIIA (T3 N0; T3 N1; N2 nur 1 Lymphknoten mikroskopisch involviert)
- Gemischte Histologie mit Teilen von SCLC
- Symptomatisches Vena-cava-superior-Syndrom
- Diffuse mediastinale Metastasierung, die nach Induktionstherapie nicht potentiell operabel ist
- T4 N3 Tumore
- Invasion von Aorta thoracica, Herz (außer dem linken Vorhof), Ösophagus oder Wirbelkörper/-säule
- Pancoast-Syndrom bei Tumoren des Sulcus superior (T3-4 Nx)
- Maligner Perikard- oder Pleuraerguss (T4 mit Perikard-/Pleuraerguss)
- Kontralaterale hiläre Lymphknotenmetastasen
- Endobronchiale Tumorausbreitung in den kontralateralen Hauptbronchus
- Ipsi- oder kontralaterale supraklav. Lymphknotenmetastasen (N3 mit supraklav. Lymphknoten)
- Frühere Verabreichung von Chemotherapie und/oder Radiotherapie, sowie einer Immuntherapie
- Aktive Infektion
- Mangelhafte Patienten-Compliance (z.B. symptomatische psychiatrische Erkrankung)
- Zustand nach Krebserkrankung (außer Nichtmelanom-Hautkrebs und Zervix-Karzinom in situ)
- Gewichtsverlust > 10% in den letzten 6 Monaten
- Keine schriftliche Einwilligungserklärung oder definitive Ablehnung der Teilnahme
- Schwangerschaft

Eingeschlossene IIIA/IIIB Subgruppen:

- N2: mehr als ein Lymphknoten betroffen oder bulky N2 (Mediastinoskopie)
- N3: kontralaterale Lymphknotenmetastasen (Mediastinoskopie)
- T4: Invasion von:
 - Arteria pulmonalis (Angio-CT/MRT/transösophageale Echokardiographie (TEE))
 - Karina (histologisch nachgewiesen)
 - Linker Vorhof (Angio-CT/MRT/TEE)
 - Vena cava (Angio-CT/MRT/TEE)
 - Ipsilaterale intrapulmonale Satelliten-Metastasen (im selben Lappen)
 - Mediastinum (nicht diffus)

Vor der Aufnahme in die Studie wurde bei jedem Patienten eine komplette Ausbreitungsdiagnostik („Staging“) durchgeführt. Hierzu gehörten eine Röntgen-Untersuchung des Thorax in zwei Ebenen, eine Computertomographie (CT) des Thorax, Abdomens und des Schädels, eine Bronchoskopie und eine zervikale Mediastinoskopie mit Probenentnahme. Darüber hinaus wurde zur Beurteilung der funktionellen Operabilität das kardiopulmonale Risiko evaluiert. Eine Lungenfunktionsuntersuchung, eine Ventilation-Perfusions-Szintigraphie, ein EKG, eine Echokardiographie und eine Duplex-Sonographie der peripheren oder zerebralen Arterien trugen zur Erfassung dieser Einschätzung und damit der vorliegenden Komorbiditäten bei.

Eine gemeinsame interdisziplinäre Konferenz bestehend aus Thoraxchirurgen, Internistischen Onkologen, Pulmonologen und Radioonkologen beurteilte jeden Patienten vor Einschluss in die Studie individuell. Dieser musste hierzu schriftlich einwilligen. Die ESPATÜ-Studie wurde von dem lokalen Ethikkomitee des Universitätsklinikums Essen und aller teilnehmenden Institutionen evaluiert und die Teilnahme jeder einzelnen Institution formal genehmigt.

Studiendesign

Die Therapie bestand aus drei Zyklen einer Induktions-Chemotherapie (Block I, „CTx“). Danach folgte eine Radiochemotherapie mit einer hyperfraktionierten akzellerierten Radiotherapie und einer simultanen Chemotherapie (Block II, „CTx/RTx“). Anschließend fand eine erneute Ausbreitungsdiagnostik (Re-Staging) in der letzten Woche der simultanen Radiochemotherapie statt. Die Patienten wurden hier erneut hinsichtlich ihrer funktionellen Operabilität und prinzipiellen Resektabilität gemeinsam evaluiert und im Falle der weiterhin vorliegenden Resektabilität randomisiert (Abbildung 3). In Arm A und bei Patienten, die als inoperabel eingestuft wurden, fand eine definitive Bestrahlung mit einer simultanen Chemotherapie statt („CTx/RTx boost“), während in Arm B die Patienten einer Thorakotomie mit dem Ziel der kompletten Resektion von residuellen Tumoranteilen unterzogen wurden.

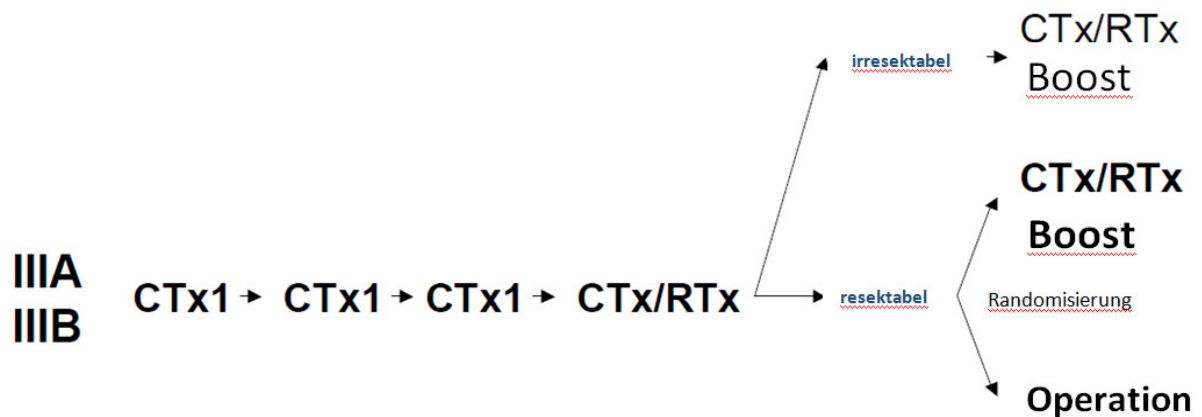


Abbildung 3: Studiendesign (Eberhardt et al., 2015)

Induktions-Chemotherapie (Block I)

Die Induktionstherapie bestand aus drei Zyklen einer Kombination aus Cisplatin (50 mg/m² am Tag 1 und 8, alle 21 Tage) und Paclitaxel (175 mg/m² am Tag 1, alle 21 Tage). Je nach Allgemeinzustand, wurden die Patienten entweder stationär oder ambulant behandelt. Die Chemotherapie wurde standardgemäß begleitet von Prednisolon, antiemetischer, antiallergischer und diuretischer Therapie sowie einer Hyperhydratation zur Cisplatingabe.

Im Falle einer Leuko-, Neutro- oder Thrombozytopenie an Tag 8, wurde die Applikation von Cisplatin in ihrer Dosis reduziert (40 mg/m²) oder verzögert, bis die Werte wieder stabil waren. Dosisreduktion (Cisplatin: 40 mg/m², Taxol: 135 mg/m²) wurde auch bei einem Kreatininanstieg, einer Mukositis, oder bei Neutropenie mit Komplikationen (febrile Neutropenie, „fever of unknown origin“) erwogen. Letztere konnten unter Umständen zur Gabe eines hämatopoetischen Wachstumsfaktors (G-CSF) im folgenden Therapiezyklus führen.

Stabile hämatologische Befunde und Kreatinin-Werte sowie die Rückbildung nicht-hämatologischer Toxizitäten waren Voraussetzung für die Verabreichung des folgenden geplanten Chemotherapie-Zyklus. Bei einer Thrombozytopenie mit Komplikationen konnten Thrombozyten transfundiert, bei einer Cisplatin-induzierten Anämie (Hb <11 g/dl) konnte Erythropoetin supportiv eingesetzt werden. Ein Abbruch der Chemotherapie erfolgte bei hochgradiger Überempfindlichkeitsreaktion (anaphylaktischer Schock) oder klinisch relevanter Neurotoxizität, einem irreversiblen Kreatininanstieg oder einer klinisch relevanten Ototoxizität.

Während der Induktions-Chemotherapie wurden jede Woche der Allgemeinzustand nach ECOG-Kriterien erhoben und die Blutwerte kontrolliert (Blutbild, Kreatinin, LDH, Bilirubin, GOT, GPT und

CRP). Auch prüfte man das Ansprechen auf die Therapie durch ein Röntgen des Thorax und ein Ultraschall des Abdomen.

Nach dem dritten Chemotherapie-Zyklus erhielten die Patienten eine erneute Ausbreitungsdiagnostik („Re-Staging“) und wurden erneut der interdisziplinären Konferenz vorgestellt. Im Falle einer Progression der Erkrankung („progressive disease“, PD) wurden die Patienten aus der Studie genommen, und mit einer definitiven Radiotherapie oder einer definitiven kombinierten Radiochemotherapie weiterbehandelt. Größere Komplikationen (deutlich reduzierter Allgemeinzustand, behandlungsassoziierte Toxizitäten, relevante Komorbiditäten) mussten ausgeschlossen sein, um die Therapie im laufenden Studienschema fortzusetzen. Nach Ende von Block I wurde an einzelnen Zentren nach Festlegung zu Studienbeginn eine prophylaktische Schädelbestrahlung angeboten.

Simultane neoadjuvante Radiochemotherapie (Block II)

Voraussetzung für die Chemotherapie im Block II waren auch hier stabile hämatologische Befunde und Kreatinin-Werte sowie fehlende höhergradige nicht-hämatologische Toxizitäten. Die simultane Radiotherapie belief sich auf eine Gesamtdosis von 45 Gy in 3 Wochen und begann an Tag 1 des Blocks II mit der Bestrahlung des primären Tumors und der mediastinalen Lymphknoten. Sie wurde hyperfraktioniert und akzelleriert appliziert:

Zweimal täglich wurden jeweils 1,5 Gy fünfmal wöchentlich bestrahlt. Die simultane Chemotherapie bestand in der Gabe von 50 mg/m² Cisplatin an Tagen 2 und 9 sowie 20 mg/m² Vinorelbin ebenfalls an Tagen 2 und 9 (mit Antiemese und Hyperhydratation analog der Induktions-Chemotherapie).

Auch in Block II reduzierte man die Chemotherapiedosierungen (Cisplatin: 40 mg/m², Vinorelbin: 15 mg/m²) oder verzögerte die Applikation bei manifester nachgewiesener Leuko- oder Neutropenie mit Komplikationen und bei höhergradiger Mukositis, Ösophagitis oder Dermatitis. Dosisveränderung oder Therapieabbruch erfolgten entsprechend der Kriterien in Block I.

Nach CT-gestützter 3D-Planung wurden die Patienten in Rückenlage mit erhobenen Armen bestrahlt. Das normale Gewebe wurde möglichst geschont und die organspezifischen Toleranzdosen berücksichtigt. Die Dosis wurde gemäß dem ICRU Referenzpunkt Nr. 62 (International Commission on Radiation Units & Measurements) und der publizierten ICRU Guidelines verschrieben (Eberhardt et al., 2015). Patienten mit hochgradig eingeschränkter

Lungenfunktion (FEV1) waren ungeeignet für die Radiotherapie. Maximal 30% des gesunden Lungenvolumens durfte einer Bestrahlungsdosis von ≥ 20 Gy ausgesetzt werden. Die Gesamtlungendosis sollte 14 Gy nicht überschreiten.

Das klinische Zielvolumen („clinical target volume“, CTV) beinhaltete den Primarius, das makroskopisch involvierte Mediastinum (+ 1 cm Rand) sowie die potentiell involvierten Lymphwege bzw. Lymphknoten. Der kontralaterale Hilus und die kontralateralen supraklavikulären Regionen nahmen kein Anteil am CTV. Das Planungs-Zielvolumen („planning target volume“, PTV) beinhaltete das CTV plus ein Rand von 0,5 - 1 cm, um die Effekte der Organ- und Patientenbewegungen und die Ungenauigkeit der Strahlen zu berücksichtigen. Anatomische Grenzen (z.B. Rippen, Wirbel) und der Sicherheitsabstand zum Rückenmark wurden respektiert.

Wöchentlich kontrollierte man die Blutwerte und dokumentierte den Allgemeinzustand sowie die Lebensqualität.

Reevaluation und Randomisierung

Am Ende von Block II wurde ein Restaging durchgeführt und die interdisziplinäre Tumorkonferenz diskutierte die jetzt vorliegenden Befunde. Das Ansprechen auf die Induktionstherapie wurde nach RECIST („Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“) (Therasse et al., 2000) eingeteilt: Keine Vergrößerung des längsten Tumordurchmessers („no change“, „stable disease“, NC), partielle Remission bzw. Ansprechen („partial response“, PR) und komplettes Ansprechen („complete response“, CR). Wenn medizinische Inoperabilität oder vorliegende technische Irresektabilität festgestellt wurde, bekam der Patient einen individualisierten definitiven Chemostrahlentherapie-Boost. Hierfür sprachen klinische oder funktionelle Faktoren (schlechter Allgemeinzustand, voraussichtlich mangelhafte postoperative Lungenfunktion, DLco, Komorbiditäten etc.), diffuse mediastinale Infiltration und die prinzipielle Ablehnung der Randomisierung seitens des Patienten. Falls der Patient operabel war, fand die Randomisierung in Arm A oder B statt.

Definitive Bestrahlung (20 oder 26 Gy) (Arm A)

Der definitive Strahlentherapie-Boost erfolgte konventionell fraktioniert (5 x 2 Gy pro Woche). Es wurde eine Dosis von 20 Gy appliziert, was eine Gesamtdosis von 65 Gy ergab. In Einzelfällen konnte eine weitere Dosisescalation von 6 Gy (Gesamtdosis 71 Gy) durchgeführt werden.

Nebenwirkungen der Strahlentherapie waren z.B. Mukositiden des Ösophagus und der Trachea, trockener Husten bei Strahlen-Pneumonitis und Entzündungen mit Ödemen. Parallel zu diesem Radiotherapie-Boost, wurden 40 mg/m² Cisplatin an Tag 2 und 15 mg/m² Vinorelbin an Tagen 2 und 9 gegeben. Stabile hämatologische Befunde waren erneut eine Voraussetzung für die Gabe der Chemotherapeutika (Abbildung 4).

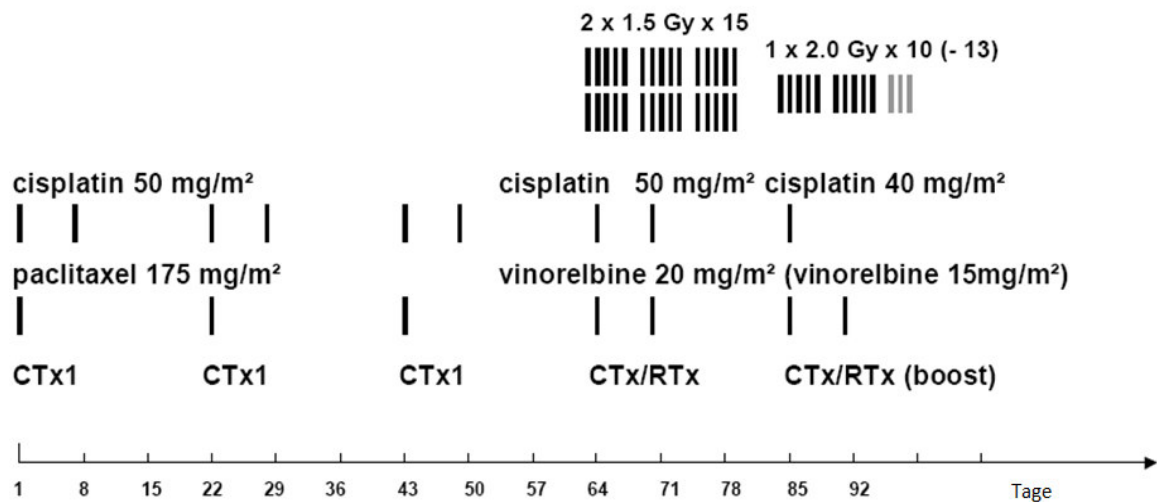


Abbildung 4: Definitive Bestrahlung, Arm A (Eberhardt et al., 2015)

Definitive Chirurgie (Arm B)

Die Operation wurde geplant, wenn eine R0-Resektion („complete resection“) nach dem Restaging für möglich gehalten wurde und der Patient auf den Operationsarm randomisiert worden war. Sie fand 3-5 Wochen nach dem Ende der Radiochemotherapie statt. Sowohl nach einer R0-Resektion als auch nach einer R1- oder einer R2-Resektion („incomplete resection“) war prinzipiell keine weitere Behandlung geplant. Die Patienten wurden dann engmaschig beobachtet (Abbildung 5).

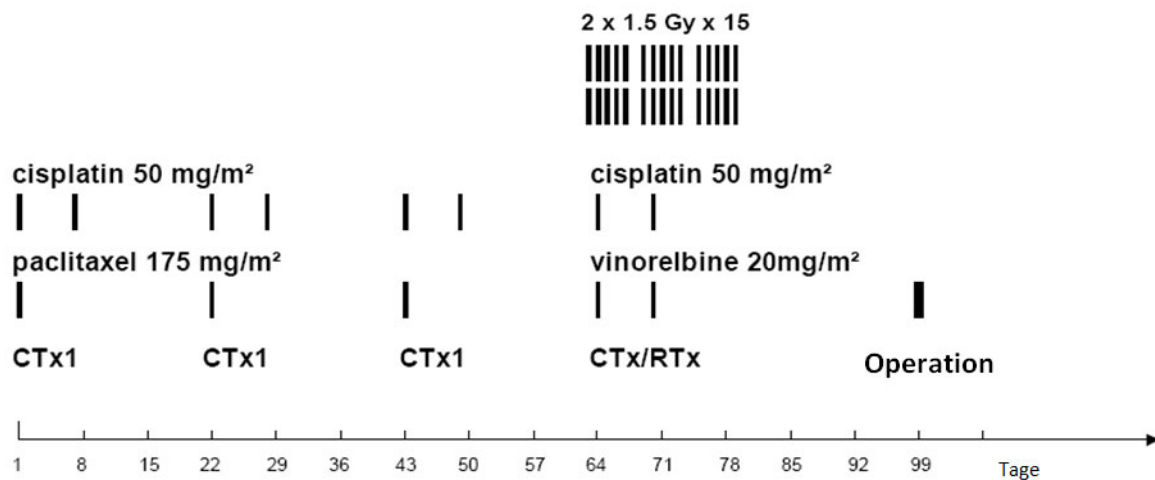


Abbildung 5: Definitive Chirurgie, Arm B (Eberhardt et al., 2015)

Follow-Up

Nach Ende der Behandlung wurde jeder Patient in dreimonatigen Abständen nachbeobachtet, um das Gesamtüberleben („overall survival“, OS) sowie das progressionfreie Überleben („progression-free survival“, PFS) im Verlauf zu dokumentieren. Die Lebensqualität wurde bewertet, der Performance Status erhoben und die hämatologischen Basisparameter und Serumchemie evaluiert. Eine Röntgenuntersuchung des Thorax in zwei Ebenen, ein Thorax-CT und ein Ultraschall des Abdomens wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Bei Verdacht auf einen Progress wurden selbstverständlich darüber hinaus weitere Untersuchungen herangezogen. Ferner erfolgte die Dokumentation von therapieassoziierten Nebenwirkungen und von Todesursache, Todesdatum und Tumorstatus, falls ein Patient starb.

2.1.2 Nicht-ESPATÜ-Patienten

Es handelte sich um Patienten, die formal die Einschlusskriterien erfüllten, die jedoch an der Studie und der damit einhergehenden Randomisierung nicht teilnehmen wollten. Sie willigten in eine detaillierte Dokumentation des Therapieverlaufs und des Follow-Ups ein. Der Unterschied zum Therapieregime der Studienpatienten bestand darin, dass fast alle eine konventionell statt eine hyperfraktionierte simultane Radiochemotherapie erhielten, das heißt es wurde einmal täglich 2 Gy, fünf Mal in der Woche bestrahlt. Nur zwei Patienten erhielten eine

hyperfraktionierte und akzellerierte simultane Radiochemotherapie, entsprechend der ESPATÜ-Studie.

2.2 Statistische Analyse

Als das Gesamtüberleben definieren wir die Zeit vom ersten Tag der Chemotherapie bis zum Zeitpunkt des Todes unterschiedlicher Ursache oder bis zum letzten bekannten Kontakt mit dem Patienten („Last-Follow-Up“). Die Dauer des Progressions-freien Überlebens wurde gewertet vom ersten Tag der Chemotherapie bis zum Zeitpunkt des Auftretens eines Krankheitsprogresses (PD), des behandlungsassoziierten Todes, sekundärer Malignome oder bis zum letzten bekannten Follow-Up des Patienten ohne Progression.

Die Analyse der Assoziation der BRCA1-, RAP80-, und 53BP1-mRNA-Expression mit dem OS, PFS, den verschiedenen Tumorhistopathologien, dem Tumorstadium, dem Geschlecht und dem Alter der Patienten wurde mittels nicht-parametrischer Testverfahren (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient, Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben) analysiert. Die Überlebenskurven für das OS und das PFS wurden mit der Methode von Kaplan und Meier erstellt. Die Assoziation der mRNA-Expression mit den Überlebensparametern OS und PFS wurde mit einem log-rank Test untersucht (Kaplan et al., 1958). Um unabhängige Prognosefaktoren für OS und PFS zu ermitteln, wurde die multivariate Cox-Regressionsanalyse eingesetzt (Cox, 1972). Folgende Parameter wurden nach Ausschaltung potentieller Störgrößen („Confounder“) evaluiert: Histologie, T-Stadium, Geschlecht und Alter. Eine Rekursive Partitionsanalyse wurde genutzt, um optimale Trennpunkte („cut-points“) der PCR-Daten zu detektieren, an denen bei Auftrennung die höchste Signifikanz mit der größtmöglichen Wahrscheinlichkeit festzustellen war. Dieser Trennpunkt wurde während der Analyse so gewählt, dass er den größtmöglichen Unterschied zwischen einzelnen Gruppen identifizierte (Hoffmann et al., 2009; Hoffmann et al., 2008). Das Signifikanzniveau wurde mittels Fisher Exact Test zweiseitig bestimmt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant definiert.

Zur Durchführung der Testverfahren wurden die Statistikprogramm SPSS für Windows, Version 19.0 (SPSS Software GmbH, München) und JMP 10.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet.

2.3 Molekulare Analysen

Die Genexpression von BRCA1, RAP80 und 53BP1 bestimmten wir durch Quantifizierung der messenger RNA (mRNA), die aus Tumorgewebe von mediastinalen Lymphknoten und aus Primärtumorgewebe isoliert wurde. Von jedem Patienten wurden Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete (FFPE-) Tumorproben untersucht. Alle molekularen Analysen wurden im molekularbiologischen Labor der Onkologie-Abteilung des Hospital Universitario Quirón Dexeus, Barcelona in Spanien durchgeführt (Costa et al., 2014; Rosell et al., 2011; Taron et al., 2004). Durch Laser-Mikrodissektion wurde ein Tumorzellanteil von mindestens 90% sichergestellt.

2.3.1 Mikrotomie

Es wurden 4µm-Schnitte auf besonders beschichtete Objektträger (Pem-Membrane Objektträger, Palm, Oberlensheim, Deutschland) aufgetragen, um das Schneiden am Mikrodissektor mittels Laser zu vereinfachen. Für jede Tumorprobe wurden mindestens drei Schnitte angefertigt. Zwei wurden auf Pem-Membrane Objektträger, einer auf einem normalen Objektträger platziert. Das Protokoll setzte sich in beiden Fällen identisch fort.

1. Die Pem-Membrane Objektträger wurden in einer Küvette mit Poly-L-Lysin 0,1% fünf Minuten lang inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die FFPE-Tumorproben wurden 30 Minuten auf einer Kühlplatte gekühlt. Ein Thermo-Wasserbad (für die Schnitte) wurde auf 42 ± 3 °C erhitzt.
2. Nun wurde die Tumorprobe im Mikrotom positioniert und die Schnittdicke auf 4 µm eingestellt. Der Messerhalter wurde so adjustiert, dass er den Paraffin-Block praktisch berührte. Anschließend ging man mit einer festen, konstanten und rhythmischen Rotationsbewegung auf das Schneiden des Paraffin-Blocks über. Man musste darauf achten, dass der Schnitt die ganze Tumorprobe umfasste. Das erhaltene Paraffinband (Abfolge der Paraffinschnitte) wurde im Wasserbad mithilfe eines Pinsels und einer histologischen Nadel gestreckt. Die Schnitte wurden mit dem Objektträger an der Wasseroberfläche aufgenommen. Dann wurden die Objektträger mit den Proben bei Raumtemperatur mindestens eine Stunde getrocknet und mit der Einschluss-Nummer beschriftet.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der Färber (LEICA, Autostainer XL, Wetzlar, Deutschland) färbte die Proben automatisch.

- Deparaffinierung und Hydratation der Probe: Xylol 10 Minuten, Ethanol absolut 3 Minuten, Ethanol 96% 3 Minuten, Ethanol 70% 3 Minuten, destilliertes Wasser 3 Minuten
- Färbung der Probe: Hämatoxylin 1:3 3 Minuten, zwei Mal Spülen in destilliertem Wasser jeweils 30 Sekunden, Automation Puffer 1x 1 Minute, destilliertes Wasser 1 Minute, Eosin 1:3 2 Minuten
- Dehydratation der Probe: Ethanol 70% 3 Minuten, Ethanol 96% 3 Minuten, Ethanol absolut 3 Minuten und zuletzt Xylol 5 Minuten.

2.3.3 Bewertung durch den Pathologen

Die Probe, die auf einem normalen Objektträger aufgetragen worden war, wurde vom Pathologen bewertet. Er kreiste die Tumorzone ein (Abbildung 6) und gab den Prozentsatz von Tumordinfiltration, Stroma, Nekrose und entzündlichem Infiltrat an. Er klassifizierte die Probe in „adäquat“ (das Gewebe enthält mehr als 20% Tumordinfiltration) oder „unzureichendes Material“ (das Gewebe enthält weniger als 20% Tumordinfiltration) und bestimmte, ob diese mikro- oder makrosezirt (Tumordinfiltration in der Probe > 80%) werden würde.

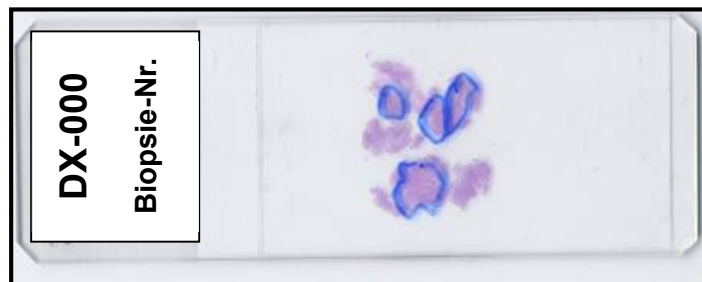


Abbildung 6: Bewertung durch den Pathologen auf der H/E-gefärbten Probe (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

2.3.4 Mikrodissektion

Die Pem-Membrane Objektträger mit den Proben wurden auf dem Objektisch des Mikrodissektors (CAPmover Microdissector, Carl Zeiss Microimaging, Barcelona, Spanien) platziert (Abbildung 7).

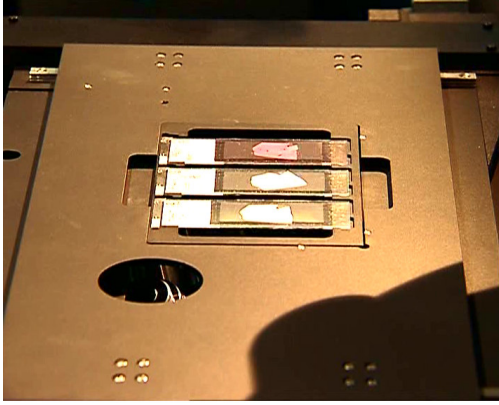


Abbildung 7: Objektisch des Mikrodissektors (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

In der von dem Pathologen markierten Zone wurden die zu mikrosezierenden tumorösen Bereiche mithilfe der Maus eingekreist (die mikroskopierten Bilder wurden am Bildschirm gezeigt, siehe Abbildung 8). Dies geschah unter Anleitung des Pathologen.

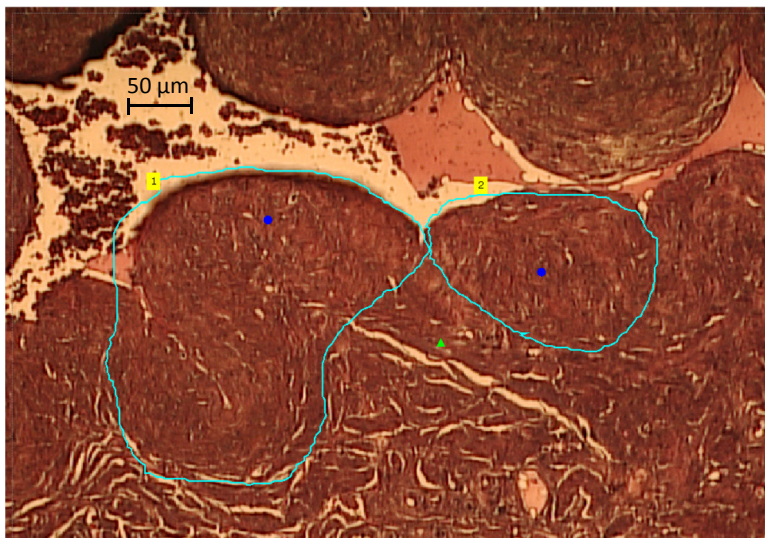


Abbildung 8: Eingekreister Tumorbereich auf mikroskopischer Ebene (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

In den Deckel eines Eppendorf-Röhrchens wurden 5 µl von Verdauungslösung II gegeben. Anschließend wurde das Eppendorf-Röhrchen in das "Insert" des Mikrodissektors angebracht (Abbildung 9).

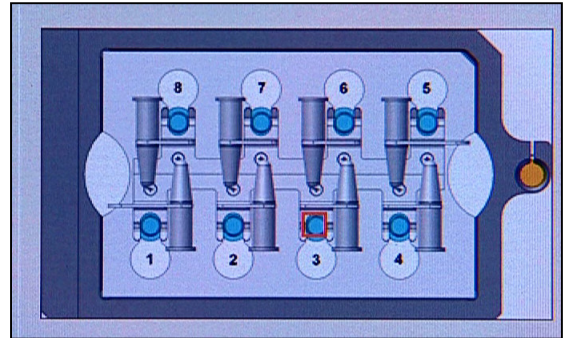
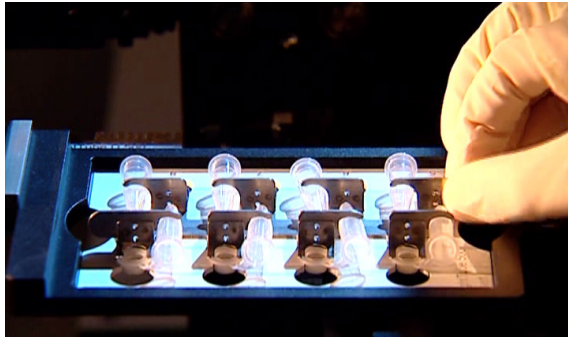


Abbildung 9: Eppendorf-Röhrchen im Insert des Mikrodissektors platziert (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

Das Eppendorf-Röhrchen wurde computergesteuert über die Probe ausgerichtet (Abbildung 10).

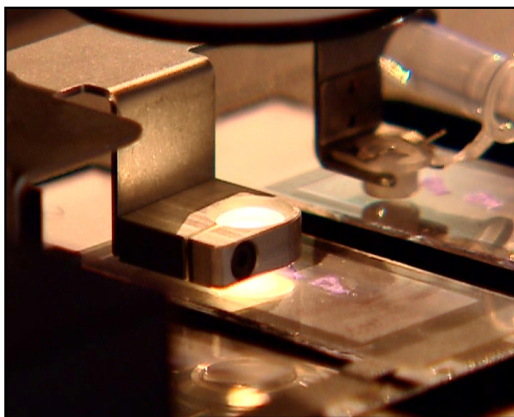


Abbildung 10: Eppendorf-Röhrchen über den Proben (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

Durch einen Klick auf Start begann die Mikrodissektion, nachdem die Energie des Laserstrahls zwischen 45% und 55% eingestellt wurde (Abbildung 11). Die richtige Energiestärke war gegeben, wenn die Schnittlinie des Lasers der in der Abbildung 12 ähnelte. Wenn die Linie dicker oder dünner erschien, musste die Energie adjustiert werden.

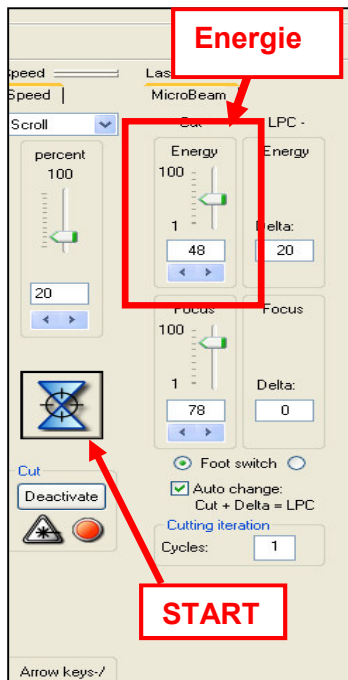


Abbildung 11: Laserstrahlenergie-Bestimmung und Start (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

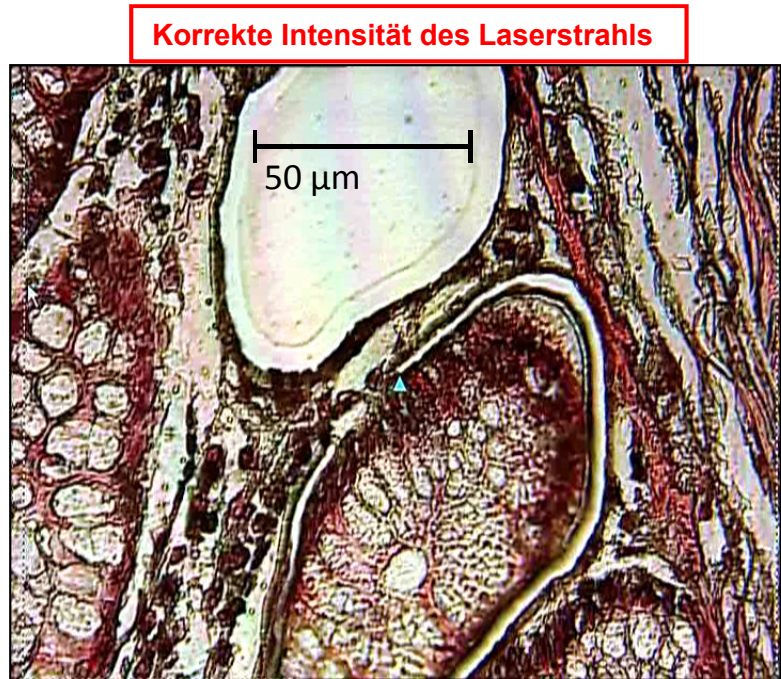


Abbildung 12: Schnittlinie des Laserstrahls (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

Am Ende der Mikrodissektion mussten die auf der gesamten Fläche lieengebliebenen geschnittenen Gewebestücke (Abbildung 13) mithilfe des Mikrodissektors eingesammelt werden. Man überprüfte ebenfalls, dass sich die Probe im Deckel des Eppendorf-Tubes befand (Abbildung 14).

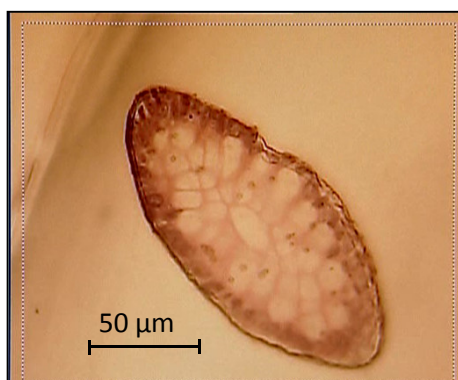


Abbildung 13: Ausgeschnittene Tumorzone (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

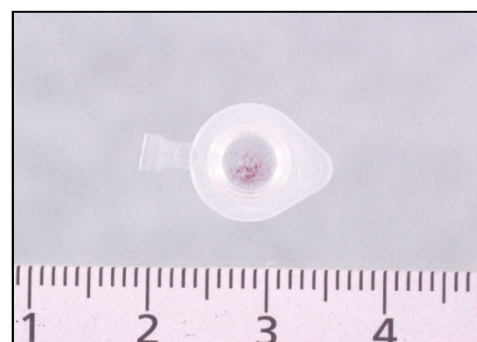


Abbildung 14: Probe im Eppendorf-Deckel (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

Parallel wurden in das Eppendorf-Röhrchen 195 µl von Verdauungslösung II pipettiert. Das Röhrchen wurde mit dem die mikrodissizierte Probe enthaltenden Deckel zugedeckt, zwei Mal mit der Hand gewendet und kurz zentrifugiert, damit die Probe nach unten sank. Zuletzt wurde das Eppendorf-Röhrchen mit der Einschluss-Nummer des Patienten etikettiert.

2.3.5 Makrodissektion

Bei einer über 80 %igen Tumordinfiltration der Probe konnte makrodisseziert werden. Man orientierte sich an der vom Pathologen markierten Tumorzone der Probe. In ein Eppendorf-Röhrchen wurden 200 µl von Verdauungslösung II pipettiert (zur Verdauung des Paraffins und der Zellmembran). Mit einer sauberen Pipettenspitze wurde mit dem Finger etwas Verdauungslösung angesaugt, die sobald auf die Probe fallengelassen wurde. Mit der Pipettenspitze wurde anschließend das Gewebe (aber nicht die Pem-Membran) gekratzt. Das Makrodissektat wurde mit der Pipettenspitze eingesammelt und in das Eppendorf-Röhrchen eingeführt. Das Röhrchen wurde kurz zentrifugiert und mit der Einschluss-Nummer etikettiert.

2.3.6 mRNA-Expressionsanalyse

2.3.6.1 mRNA-Extraktion

Um die mRNA-Expressionsniveaus unserer Zielgene zu bestimmen, musste die mRNA aus dem Tumorgewebe extrahiert werden.

1. Die durch Mikro- oder Makrodissektion erhaltenen Proben wurden einer Zellyse mit EDTA-Lösung 0,1M, Natriumdodecylsulfat (SDS) 2%, Tris-Chlorid 0,5M und Proteinase K (20mg/ml) (QUIAGEN, Hilden, Deutschland) ausgesetzt.
2. Die Trennung der Nukleinsäure von den restlichen Zellbestandteilen erfolgte mit einer Chloroform-Isoaminoalkohol-Phenol-Mischung (pH=4,5-5,5, APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland). Hierfür wurde Chloroform-Isoaminoalkohol mit Phenol im Verhältnis 1:5 verdünnt (Verdünnung 1:6). Die wässrige Phase wurde anschließend mit 2,5 µl Glykogen (20 mg/ml) (ROCHE, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), 300 µl Isopropanol (PANREAC, Barcelona, Spanien) und 20 µl Natriumacetat (APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland) behandelt, um die Nukleinsäure auszufällen. Die erhaltene Lösung wurde 30 Minuten bei $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend zentrifugierte man 10 Minuten lang bei 12600rpm \pm 200rpm und erhielt ein Pellet, welches mit

Ethanol 70% gewaschen wurde. Das Material ließ man bei Raumtemperatur trocknen und anschließend resuspendierte man es in 53 µl sterilem destilliertem Wasser (BRAUN, Melsungen, Deutschland).

3. Um die kontaminierende DNA zu beseitigen, wurde mit einem Kit der Firma AMBION (Darmstadt, Deutschland) (DNase/DNase-Puffer *10x Inactivation buffer*) gearbeitet: 53 µl Probe wurde mit 1,5 µl DNase-Enzym und 6 µl Verdauungspuffer (Wasser, TRIS 0,5 M, Proteinase K (20mg/ml), EDTA 0,1M und SDS 2% (QUIAGEN, Hilden, Deutschland)) 30 Minuten lang bei $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$ behandelt. Freies Enzym wurde inaktiviert indem man 6 µl *10x Inactivation buffer* hinzufügte. Zuletzt wurde die Probe bei 1000rpm \pm 200rpm zentrifugiert.

2.3.6.2 Reverse Transkription

Die cDNA wurde mithilfe eines Kits der Firma INVITROGEN (Carlsbad, USA) synthetisiert, dass 200u/µl Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV RT) und 20u/µl RNase Out (zur Depletion der RNase-Aktivität) enthielt.

1. 10 µl der RNA-Probe wurden mit 2 µl von MIX 1 (12,5 µl Random Primer 250ng/µl (INVITROGEN, Carlsbad, USA), 150 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's) 10 mM (PROMEGA, Madison, USA) und 137,5 µl steriles destilliertes Wasser) in einem Tube vermischt. Dasselbe wurde mit den Extraktionskontrollen, den kommerziellen RNA-Kalibratoren aus humanem Leber- und Lungengewebe (1µg/µl) (STRATAGENE, La Jolla, USA) und mit sterilem destilliertem Wasser durchgeführt.

2. Diese Proben wurden in den Thermocycler eingeführt und Temperaturänderungen unterworfen (Abbildung 15). Nach dem ersten Schritt (Temperaturabfall von 65°C auf 25°C) wurden 8 µl von MIX 2 (1 µl M-MLV RT, 1 µl RNase Out, 500 µl Dithiothreitol (DTT) und 1000 µl Verdauungspuffer 5X (INVITROGEN, Carlsbad, USA)) in jede Probe hinzugefügt. Am Ende wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt.

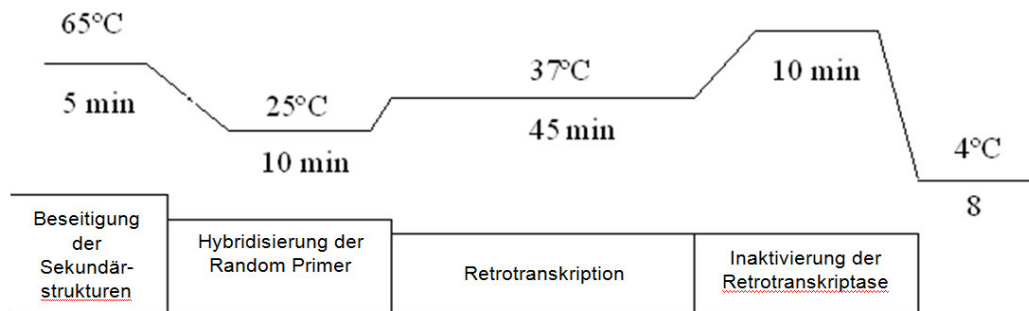


Abbildung 15: Reverse Tanskription im Thermocycler (Molecular Oncology Laboratory-Institute Dr Rosell)

2.3.6.3 Real-Time PCR und Quantifizierung der Genexpression

Die Real-Time PCR basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) und ermöglicht gleichzeitig (in Echtzeit, „real-time“) die Quantifizierung der gewonnenen Nukleinsäuren durch Fluoreszenz-Messungen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Wir benötigen genspezifische Primer und Sonden. Jede Sonde hat am 5′-Ende ein Sender-Fluorochrom (Fluorescein) und am 3′-Ende ein Empfänger-Fluorochrom (Quencher). Während der Extensions-Phase der PCR, wird die Sonde vom 5′-Ende aus durch die 5′-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, somit trennen sich Fluorescein und Quencher. Letzterer kann die Energie des Fluorophors nicht mehr absorbieren und das Fluoreszenz-Signal steigt. Dieses Signal wurde in einen numerischen Wert, den Ct-Wert, konvertiert. Der Ct-Wert spiegelt die Anzahl an nötigen Zyklen für einen signifikanten Fluoreszenz-Anstieg des Zielgens wieder, bezogen auf das Basis-Signal (Hoffmann et al., 2008). Er ist umgekehrt proportional zur initialen Menge an cDNA.

1. Man mischte 2,5 µl der in der reversen Transkription erhaltenen cDNA (der Proben und Kontrollen) mit 10 µl eines genspezifischen MIX. Man untersuchte sowohl die Zielgene (*BRCA1*, *RAP80* und *53BP1*) als auch β -Aktin als endogene Kontrolle. β -Aktin hat ein konstantes Expressionsniveau in fast allen Gewebezellen und eine geringe Variabilität der Expression unter den Individuen einer Spezies. Der genspezifische MIX enthielt 5000 µl TaqMan® Universal Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS (AB), Foster City, USA), 2336 µl sterilem destilliertem Wasser, 600 µl genspezifischer Primer (ABI, s.u.) und 150 µl genspezifischer Sonde (ABI).
2. Die cDNA wurde mittels real-time PCR amplifiziert. Das Detektionssystem ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (AB) quantifizierte die Fluoreszenzsignale.

Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte gemäß der vergleichenden „Cycle threshold“ (Ct)-Methode (Schmittgen et al., 2008). Bei dieser Methode wird das Fluoreszenzsignal eines Referenzgens (endogene Kontrolle, z.B. β -Aktin) mit dem Fluoreszenzsignal des Zielgens während der exponentiellen Phase des Fluoreszenz-Anstiegs (nur dann herrschen optimale Reaktionsbedingungen) verglichen. Die Kalibrierung von β -Aktin und unserer Zielgene BRCA1, RAP80 und 53BP1 erfolgte mittels Standard-RNA aus humanem Leber- und Lungengewebe der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA). Die Amplifikations-Effizienz der Primer und der Sonden, die man für die verschiedenen Zielgene und für β -Aktin benutzte, mussten vergleichbar sein.

Durch die Verwendung der Kalibratoren in jedem Lauf konnten Unterschiede der Lösungen und die PCR-Effektivität ausgeglichen werden, denn jede Platte wurde durch die Kalibratoren normalisiert. Die Endergebnisse wurden folgendermaßen bestimmt: $2^{-(\Delta Ct \text{ Probe} - \Delta Ct \text{ Kalibrator})}$. Die ΔCt Werte des Kalibrators und der Patientenprobe wurden durch Subtraktion des Ct-Wertes des Zielgens von dem Ct-Wert des β -Aktin-Gens ermittelt. In allen Experimenten wurden nur dreifache Ausführungen mit einer Standardabweichung („standard deviation“, SD) von $<0,25$ im Ct-Wert akzeptiert. Darüber hinaus wurde für jede Probe eine Kontrolle ohne darin enthaltene Reverse Transkriptase in derselben Platte mit analysiert, um eine DNA-Kontamination auszuschließen.

Auch wurde eine Kontrolle mitanalysiert, die alle Reagenzien enthielt mit Ausnahme der cDNA-Probe (Kontrolle ohne Probe, No Template Control, „NTC“). Der Ct-Wert beider Kontrollen (NTC und steriles destilliertes Wasser der Reverse Transkription) durfte nicht kleiner als 35 oder nicht mehr als 5% des höchsten Ct-Wertes (geringsten Signals) für β -Aktin betragen. Um diesen Prozentsatz zu berechnen benutzte man folgende Formel:

$$100/2^{(Ct\text{-Wert des endogenen Gens c-ext} - Ct\text{-Wert des endogenen Gens der Probe mit höchstem Ct)}}$$

Wenn der Ct-Wert des sterilen destillierten Wassers der Reversen Transkription oder des NTC kleiner als 35 betrug, wurde diese Analyse verworfen, da die Probe mit DNA kontaminiert war.

2.3.6.4 Entwurf und Qualitätskontrollen der genspezifischen Primer und Sonden

Die spezifischen Primer und die Sonden wurden mit Hilfe des Software-Programms *Primer Express 2.0 Software ABI* entworfen (Tabelle 6). Mit ABI wurden überdies Qualitätskontrollen und in vitro-Experimente durchgeführt, um mögliche Homologien mit anderen Sequenzen zu erkennen. Auch legten wir die Spezifität, Sensitivität und Linearität des Entwurfs fest.

Alle Primer und die Sonden wurden validiert, indem man eine Verdünnungsreihe mit 12 jeweils dreifach angesetzten Verdünnungsstufen (Verdünnung 1:2) vornahm (Bestimmung des Linearitätsbereichs). Dazu verwendete man die zuvor aus der Standard-RNA (Lunge) hergestellte cDNA. Auch wurden die Primerpaare dadurch validiert, dass wir die Amplifikations-Produkte derselben Standard-RNA doppelsträngig sequenzierten und diese auf Übereinstimmung mit der Sequenz der Zielgene überprüften.

Tabelle 6: Sequenz der Primer und Sonden, die in der Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR benutzt wurden.

GENE	PRIMER		SONDEN
β-ACTIN	F	5' TGAGCGCGGCTACAGCTT 3'	6FAM 5' ACCACCACGGCCGAGCGG 3' TAMRA
	R	5' TCCTTAATGTCACGCACGATTT 3'	
BRCA1	F	5' GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTTA 3'	6FAM 5' CCACTCAGCAGAGGG 3' MGB
	R	5' GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGGT 3'	
RAP80	F	5' ACATCAAGTCTTCAGAAACAGGAGC 3'	6FAM 5' TCAGGGTGCCTTCACCA 3' MGB
	R	5' TGCAGCCTGCCTCTCCAT 3'	
53PB1	F	5' GTCAGGTCATTGAGCAGTTACCTC 3'	6FAM 5' GGACAAGCAGTGTCT 3' MGB
	R	5' TCCTCCACAGCAGGAGCAG 3'	

3 Ergebnisse

3.1 Patient-Flow (Consort-Diagramm)

Insgesamt wurden in die Untersuchung 100 Patienten mit einem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom im Stadium III aufgenommen, die sich erstmalig zwischen Februar 2004 und Februar 2011 am Westdeutschen Tumorzentrum vorstellten. Von diesen waren 71 Patienten Studienteilnehmer der ESPATÜ-Studie und 29 Patienten waren analog des ESPATÜ-Studienprotokolls behandelt worden. Bei ihnen lagen individuell Gründe vor, die eine Studienteilnahme nicht möglich machten. Bei 83 von den 100 Patienten konnte die Höhe der mRNA-Expression von mindestens einem der 3 DNA-Reparaturgene bestimmt werden. Bei den übrigen 17 Patienten war die Tumorprobe ungeeignet für die mRNA-Quantifizierung. Abbildung 16 zeigt das Consort Diagramm der eingeschlossenen Patientengruppe.

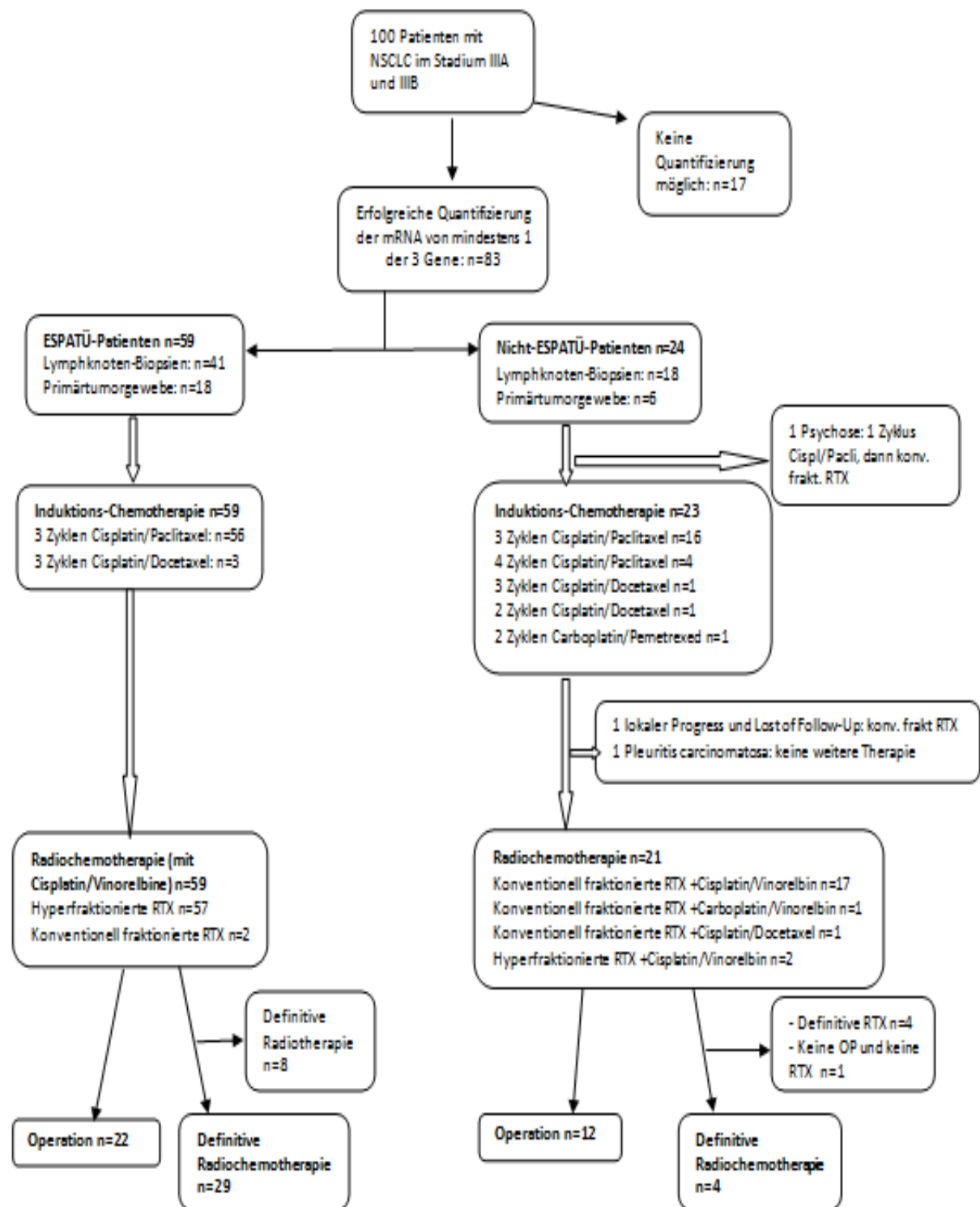


Abbildung 16: Consort-Diagramm

3.2 Patientencharakteristik

Von den 100 aufgenommenen Patienten waren 69 männlichen und 31 weiblichen Geschlechts. Die Charakteristika aller Studienpatienten sind in Tabelle 7 zusammengestellt. 51 Patienten wurden im Stadium IIIA und 49 Patienten im Stadium IIIB diagnostiziert. Die Patienten wiesen einen guten Allgemeinzustand („performance status“, PS) bei Diagnosestellung auf. Nach der ECOG Klassifikation (Oken et al., 1982) hatten 55 Patienten einen PS von 0 und 34 Patienten einen PS von 1, während bei 11 Patienten der initiale ECOG-Status nicht erhoben worden war. Initial fand in Deutschland die histopathologische Befundung der Tumoren der eingeschlossenen Patienten statt. Diese wurde vor der molekularen Analyse in Barcelona an dem dort verarbeiteten Tumormaterial erneut vorgenommen. Bezüglich dieser zweifachen Untersuchung am Mikroskop gab es einige Abweichungen: Der Beurteilung in Essen nach, hatten 43 Patienten ein Adenokarzinom, 43 Patienten ein Plattenepithelkarzinom, 6 ein großzelliges und 6 Patienten ein adenosquamöses Karzinom. Gemäß der Beurteilung des Pathologen in Spanien, hatten 47 Patienten ein Adenokarzinom, 41 Patienten ein Plattenepithelkarzinom, 3 wiesen großzellige Karzinome auf und 5 Patienten hatten ein adenosquamöses Karzinom. Kleinzellige histologische Komponenten waren nicht erlaubt. Die Diskrepanzen sind am ehesten auf das Vorliegen von Mischtumoren und untersuchte Schnitte aus unterschiedlichen Lymphknotenarealen zurückzuführen.

Tabelle 7: Patientencharakteristik

Eigenschaft	ESPATÜ (n=71)	%	Nicht-ESPATÜ (n=29)	%	Gesamtgruppe (n=100)	%
Geschlecht						
Männlich	50	70,4	19	65,5	69	69
Weiblich	21	29,6	10	34,5	31	31
Alter (in Jahren)						
Median (Jahre)	59		58		58,5	
Bereich (Jahre)	41-74		36-76		36-76	
<60	39	54,9	18	62,1	57	57
60-65	18	25,4	6	20,7	24	24
>65	14	19,7	5	17,2	19	19
ECOG Performance Status						
0	44	62,0	11	37,9	55	55
1	27	38,0	7	24,1	34	34
Keine Angabe	0	0	11	37,9	11	11

Fortsetzung Tabelle 7:

Eigenschaft	ESPATÜ (n=71)		Nicht-ESPATÜ (n=29)		Gesamtgruppe (n=100)	
		%		%		%
Histopathologie (D)						
Adenokarzinom	25	35,2	18	62,1	43	43
Plattenepithelkarzinom	36	50,7	7	24,1	43	43
Großzelliges Karzinom	6	8,5	0	0	6	6
Adenosquamöses Karzinom	2	2,8	4	13,8	6	6
NOS	2	2,8	0	0	2	2
Histopathologie (Barcelona)						
Adenokarzinom	29	40,9	18	62,1	47	47
Plattenepithelkarzinom	34	47,9	7	24,1	41	41
Großzelliges Karzinom	3	4,2	0	0	3	3
Adenosquamöses Karzinom	3	4,2	2	6,9	5	5
NOS	2	2,8	2	6,9	4	4
Zigarettenkonsum						
Nichtraucher	6	8,5	3	10,3	9	9
Raucher	64	90,1	26	89,7	90	90
Median (py)	40		35		42,5	
Bereich (py)	3-110		1-80		1-110	
aktuell	11	15,5	6	20,7	17	17
Keine Mengenangabe	11	15,5	5	17,2	16	16
<30 py	13	18,3	7	24,1	20	20
≥30 py	40	56,3	14	48,3	54	54
Keine Angabe	1	1,4	0	0	1	1
Laktatdehydrogenase						
normal	58	81,7	19	65,5	77	77
erhöht (≥250 U/l)	9	12,7	10	34,5	19	19
Keine Angabe	4	5,6	0	0	4	4
Stadium						
IIIA	36	50,7	15	51,7	51	51
T1-2 N2	21	29,6	9	31,0	30	30
T3 N1-2	7	9,9	2	6,9	9	9
T4 N0-1	8	11,3	4	13,8	12	12
IIIB	35	49,3	14	48,3	49	49
T4 N2	22	31,0	2	6,9	24	24
T1-4 N3	13	18,3	12	41,4	25	25

Patienten der ESPATÜ-Studie mit Therapiemodifikationen

Eine Patientin wurde aufgrund der Entwicklung einer höhergradigen Polyneuropathie nach der Induktion aus der Studie ausgeschlossen. Sie erhielt danach eine konventionell fraktionierte Radiotherapie ergänzt durch simultane Chemotherapie mit Vinorelbin, gefolgt von einer definitiven Bestrahlung mit 20 Gy. Ein weiterer Patient erhielt nur 1 ½ Zyklen Induktions-Chemotherapie. Er erlitt einen thrombotischen Verschluss der A. carotis interna (bekannte

periphere arterielle Verschlusskrankheit) und es folgte eine Chemotherapie mit simultaner konventionell fraktionierter Radiotherapie. Bei beiden Patienten gelang die Quantifizierung der Genexpressionshöhe von keinem der 3 Gene.

Nicht-ESPAÜ-Patienten mit Therapiemodifikationen

Zwei Patienten erhielten eine Induktionschemotherapie mit Cisplatin und Docetaxel (statt Cisplatin und Paclitaxel). Ein Patient wurde aufgrund der Komorbiditäten initial mit Carboplatin und Pemetrexed therapiert, auch erhielt er in Block II neben der Radiotherapie die Kombination Carboplatin und Vinorelbin. Eine Patientin erhielt nach der Induktion keine weitere Therapie. Bei ihr wurde ein maligner Pleuraerguss diagnostiziert. Sie wurde trotzdem innerhalb der „intend to treat“-Gruppe ausgewertet. Bei einer weiteren Patientin musste die Induktions-Chemotherapie nach dem ersten Zyklus beendet werden, da sie eine schizophrene Psychose entwickelte. Es folgte bei ihr eine konventionell fraktionierte palliative Radiotherapie.

3.3 Analyse der BRCA1-mRNA-Expression

Bei 77 von den 100 Patienten konnte die Höhe der BRCA1-mRNA-Expression mittels RT-PCR bestimmt werden.

3.3.1 Unterschied zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen

Die Daten zeigen einen hoch signifikanten Unterschied ($p=0,001$, Tabelle 8, Abbildung 17) in der BRCA1-mRNA-Expression zwischen Adeno- (Median 3,15) und Plattenepithelkarzinomen (Median 7,24) der Lunge.

Tabelle 8: BRCA1-Expression bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen (Mann-Whitney-U Test)

BRCA1-mRNA-Expression	Adenokarzinom	Plattenepithelkarzinom
Stichprobengröße	32	36
Niedrigster Wert	0,42	0,65
Höchster Wert	17,21	34,91
Median	3,15	7,24
95% Konfidenzintervall für den Median	2,8200 bis 5,7213	5,3461 bis 9,7360
zweiseitige Wahrscheinlichkeit	p = 0,0011	

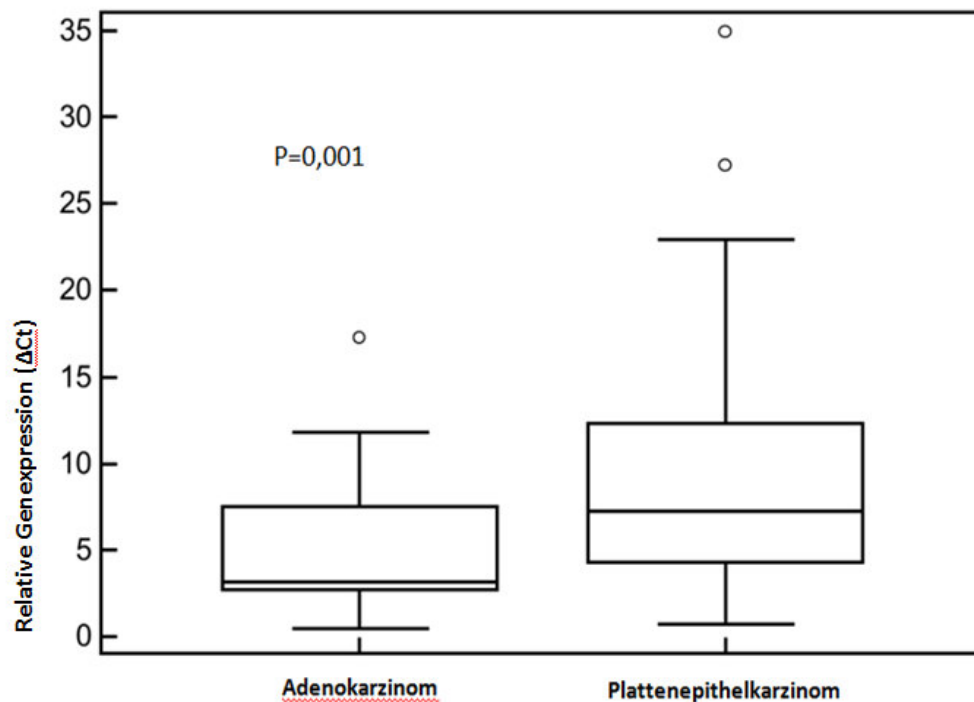


Abbildung 17: BRCA1-Expression bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Histologie-Typen.

Bei einer Analyse nur derjenigen Patienten, die innerhalb der ESPATÜ-Studie behandelt wurden, war ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p=0,008$, Tabelle 9, Abbildung 18) zwischen Adeno- (Median 3,15) und Plattenepithelkarzinomen (Median 7,24) darstellbar.

Tabelle 9: BRCA1-Expression bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen (spanischer Pathologe) der ESPATÜ-Studienpatienten (Mann-Whitney-U Test)

BRCA1-mRNA-Expression bei ESPATÜ-Patienten	Adenokarzinom	Plattenepithelkarzinom
Stichprobengröße	22	28
Niedrigster Wert	0,64	0,78
Höchster Wert	22,87	34,91
Median	3,15	7,24
95% Konfidenzintervall für den Median	2,7558 bis 7,7103	5,7530 bis 11,1100
zweiseitige Wahrscheinlichkeit	p = 0,0081	

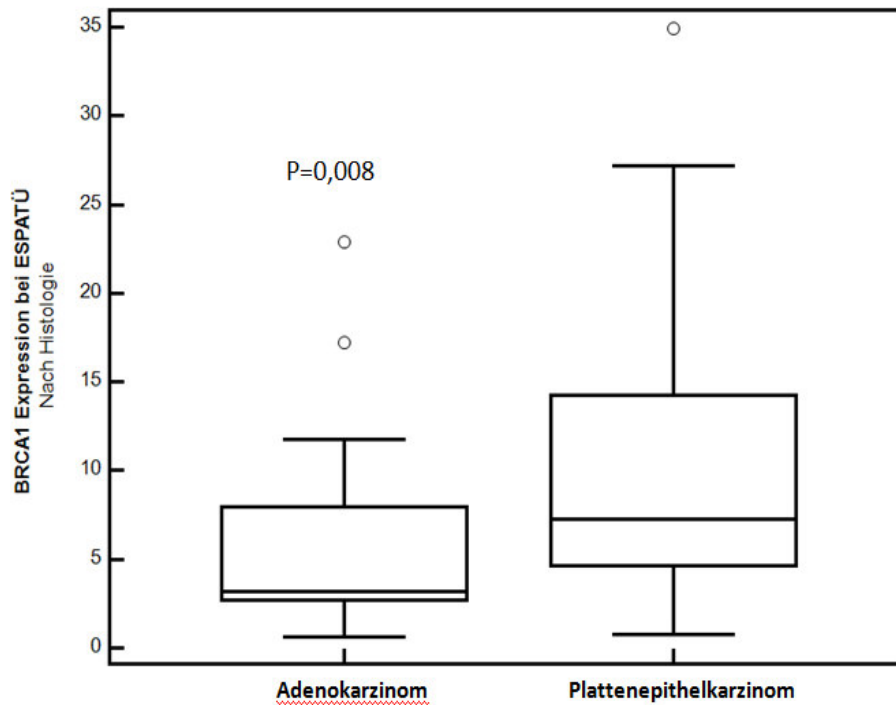


Abbildung 18: BRCA1-Expression bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen (spanischer Pathologe) der ESPATÜ-Studienpatienten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Histologie-Typen.

Auf der Abbildung 19 ist die BRCA1-mRNA-Expression aller vier Tumorentitäten der ESPATÜ-Studienpatienten quantitativ dargestellt.

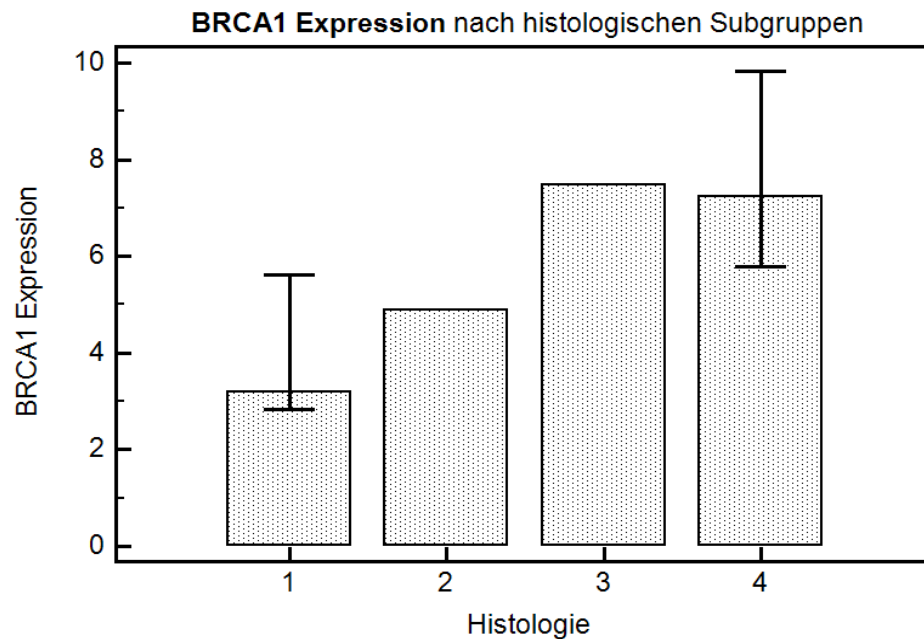


Abbildung 19: BRCA1-Expression aller vier Tumorentitäten der ESPATÜ-Studienpatienten. 1: Adenokarzinom, 2: adenosquamöses Karzinom, 3: großzelliges Karzinom, 4: Plattenepithelkarzinom.

3.3.2 Unterschied zwischen beiden Geschlechtern

Es wurde kein signifikanter Unterschied ($p=0,90$, Tabelle 10, Abbildung 20) in der BRCA1-mRNA-Expression zwischen Männern (Median 6,17) und Frauen (Median 7,67) festgestellt.

Tabelle 10: BRCA1-Expression bei Männern und Frauen (Mann-Whitney-U Test)

BRCA1-mRNA-Expression	Männer	Frauen
Stichprobengröße	39	16
Niedrigster Wert	0,75	0,64
Höchster Wert	34,91	22,87
Median	6,17	7,665
95% Konfidenzintervall für den Median	4,0568 bis 7,7091	2,5576 bis 12,3312
zweiseitige Wahrscheinlichkeit	p = 0,9041	

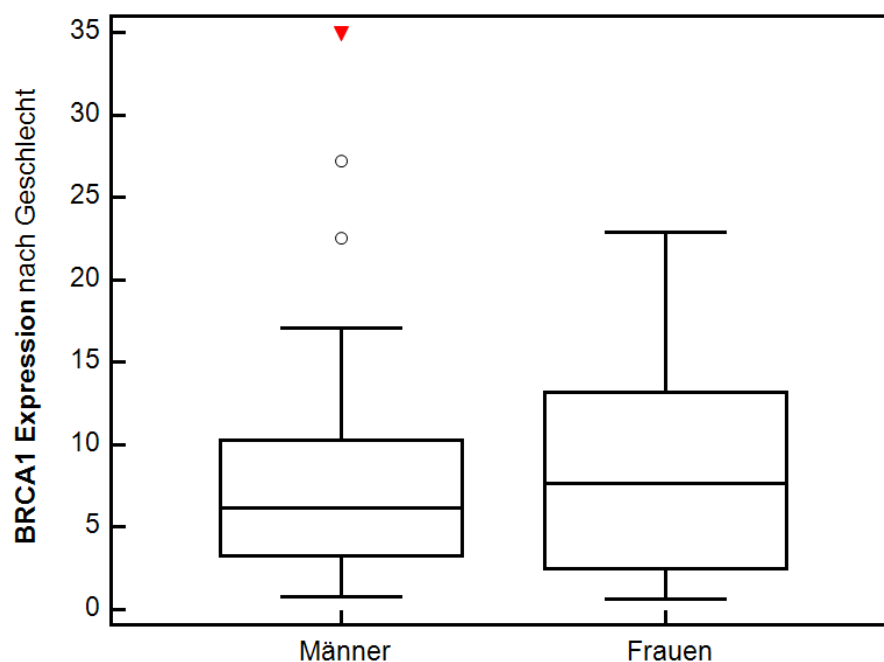


Abbildung 20: BRCA1-Expression bei Männern und Frauen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Geschlechtern.

3.3.3 Unterschied des OS zwischen Patienten mit niedriger und hoher Expression

In der Gruppe der ESPATÜ-Patienten ist ein signifikanter Unterschied ($p=0,05$, Tabelle 11, Abbildung 21) in der Gesamtüberlebenszeit festzustellen zwischen Patienten, die BRCA1 unter und Patienten, die BRCA1 über der 60. Perzentile exprimieren (Median 27 Monate vs. 65

Monate). Diejenigen, deren Expression erhöht war, haben unter der beschriebenen multimodalen Behandlung im Durchschnitt länger gelebt.

Tabelle 11: OS bei hoher und niedriger BRCA1-Expression in der ESPATÜ-Patientengruppe (Kaplan-Meier-Kurve)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	29	26
Mediane Überlebenszeit	27	65
Signifikanz	p=0,050	
Hazard ratio	0,5209	
95% Konfidenzintervall	0,2734 bis 0,9924	

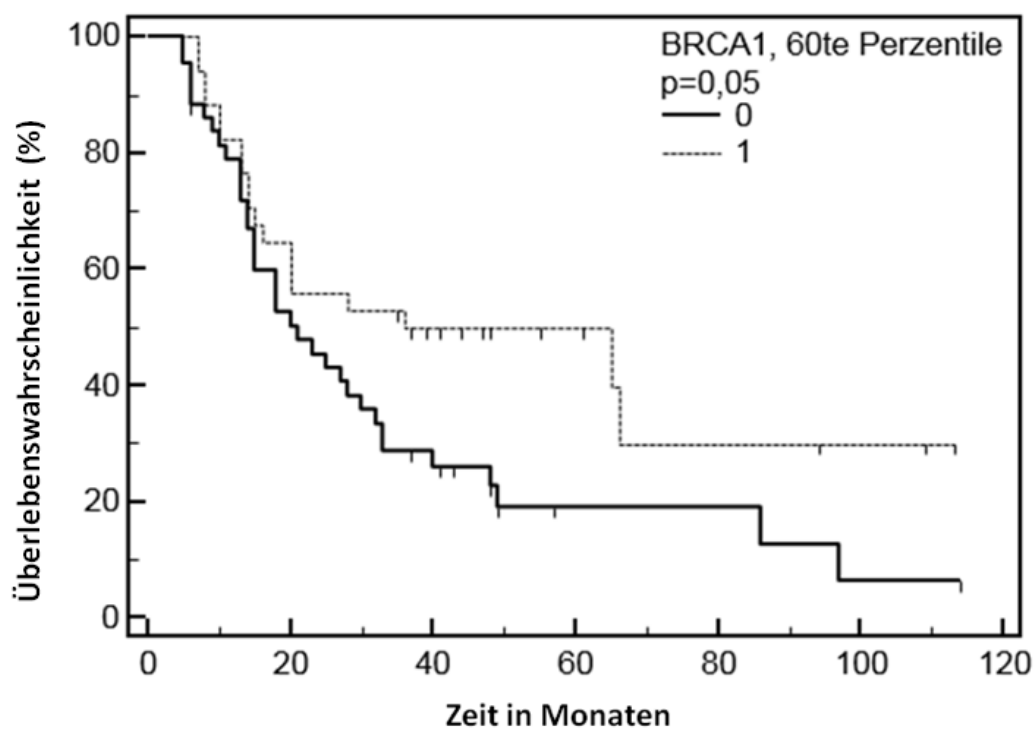


Abbildung 21: Overall survival bei hoher und niedriger BRCA1-Expression in der ESPATÜ-Patientengruppe. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben.

Betrachtete man die gesamte Gruppe, war die Darstellung des Unterschiedes zwischen Patienten mit hoher und niedriger Expression sogar noch deutlicher (p=0,04, Tabelle 12, Abbildung 22).

Tabelle 12: OS bei hoher und niedriger BRCA1-Expression (Kaplan-Meier-Kurve)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	43	34
Mediane Überlebenszeit	21	36
Signifikanz	p=0,041	
Hazard ratio	0,5693	
95% Konfidenzintervall	0,3339 bis 0,9706	

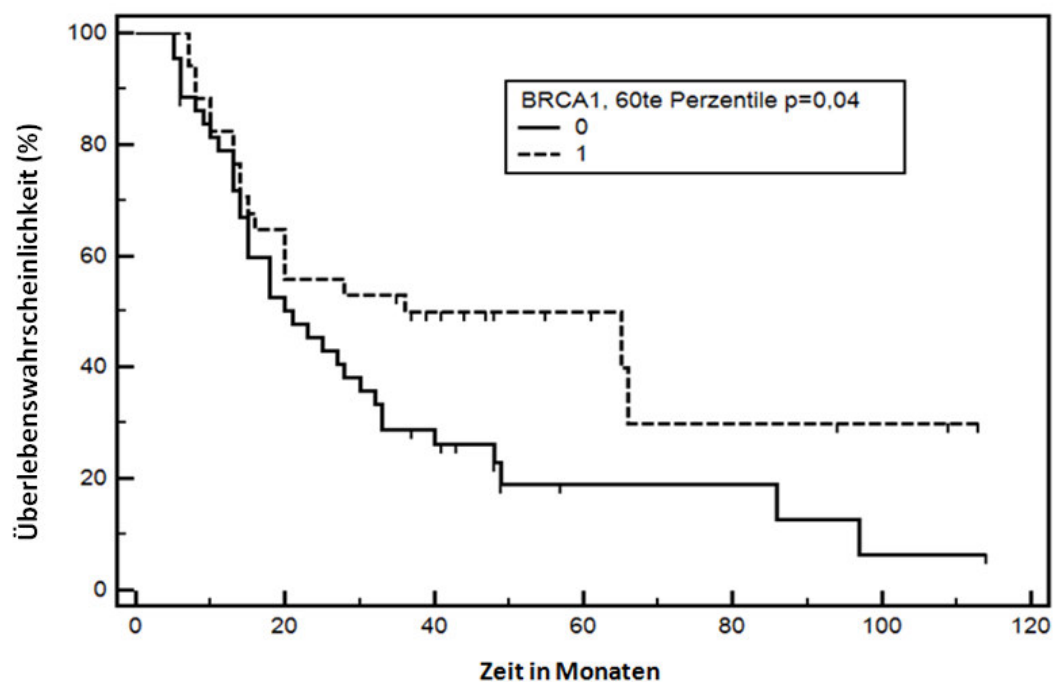


Abbildung 22: Overall survival bei hoher und niedriger BRCA1-Expression. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben.

3.3.4 Unterschied des PFS zwischen Patienten mit niedriger und hoher Expression

Die Daten zeigen einen signifikanten Unterschied ($p=0,007$, Tabelle 13, Abbildung 23) in der progressionsfreien Überlebenszeitdauer zwischen Patienten, deren BRCA1-Expression unter (Median 13 Monate), und denen, deren Expression über (Median 18 Monate) 6,5 lag. Diejenigen Patienten, die BRCA1 höher als 6,5 ΔCt exprimierten, haben länger ohne einen Fortschritt der Erkrankung leben können.

Tabelle 13: PFS bei hoher und niedriger BRCA1-Expression (Kaplan-Meier Kurve)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	41	36
Mediane Überlebenszeit	13	18
Signifikanz	p=0,0074	
Hazard ratio	0,5139	
95% Konfidenzintervall	0,3106 bis 0,8504	

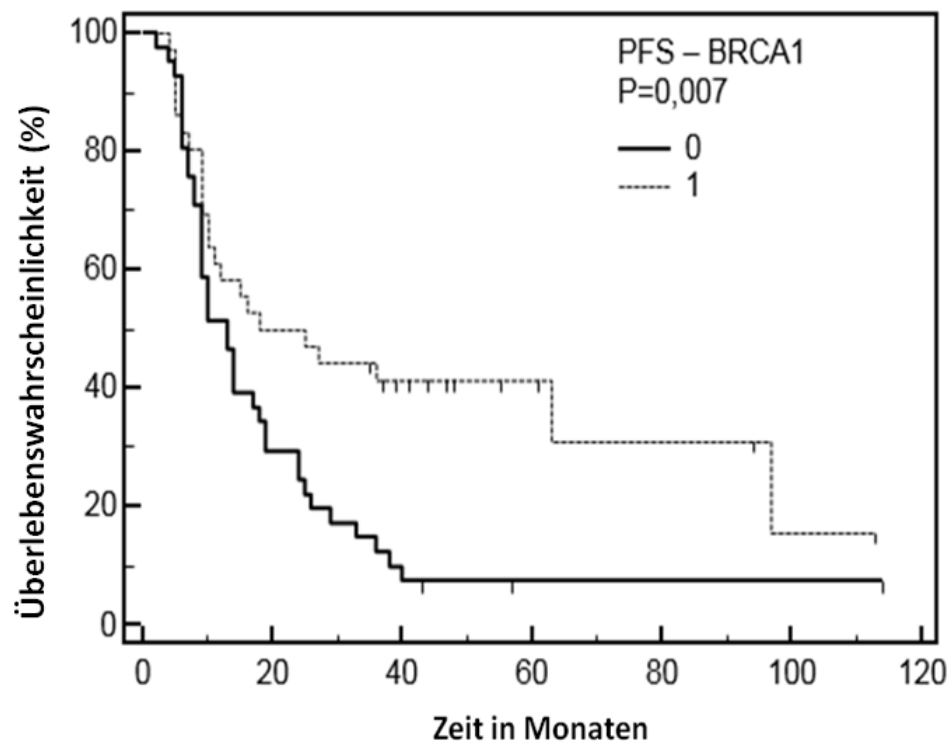


Abbildung 23: Progression free survival bei hoher und niedriger BRCA1-Expression. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben.

Auch unter den ESPATÜ-Patienten allein zeigte sich ein signifikantes Ergebnis (p=0,03, Tabelle 14).

Tabelle 14: PFS bei hoher und niedriger BRCA1-Expression unter den ESPATÜ-Patienten (Kaplan-Meier Kurve)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	27	28
Mediane Überlebenszeit	14	36
Signifikanz	p=0,0327	
Hazard ratio	0,5274	
95% Konfidenzintervall	0,2840 bis 0,9793	

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur BRCA1-mRNA-Expression

Die Quantifikation der mRNA-Expression von BRCA1 zeigte, sowohl in der gesamten als auch in der ESPATÜ-Patientenpopulation allein, signifikante Unterschiede zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge und zwischen den primären Tumorausbreitungsstadien T1 und T4 (siehe im Anhang Abbildung 42). In Plattenepithelkarzinomen und Tumoren mit initialem T4-Stadium waren höhere BRCA1-Expressionen anzutreffen. In der Gesamtpopulation hatten solche Patienten, die BRCA1 über der 60. Perzentile exprimierten insofern einen signifikanten Überlebensvorteil, als dass sie insgesamt länger lebten und eine längere Zeit ohne Krankheitsprogress verblieben. Das Expressionsmuster dieses Gens blieb von dem Geschlecht unbeeinflusst.

3.4 Analyse der 53BP1-mRNA-Expression

Die Höhe der 53BP1-mRNA-Expression konnte bei 77 von den 100 Patienten mittels RT-PCR bestimmt werden.

3.4.1 Unterschied zwischen den Geschlechtern

Zwischen Männern (Median 3,63) und Frauen (Median 3,59) wurde kein Unterschied ($p=0,80$, Tabelle 15, Abbildung 24) in der 53BP1-mRNA-Expression detektiert.

Tabelle 15: 53BP1-Expression bei beiden Geschlechtern (Mann-Whitney-U Test)

53BP1-mRNA-Expression	Frauen	Männer
Stichprobenzahl	21	56
Niedrigster Wert	0,82	0,53
Höchster Wert	10,38	15,2
Median	3,59	3,63
95% Konfidenzintervall für den Median	2,4980 bis 6,1940	2,9600 bis 4,8764
Zweiseitige Wahrscheinlichkeit	p = 0,7969	

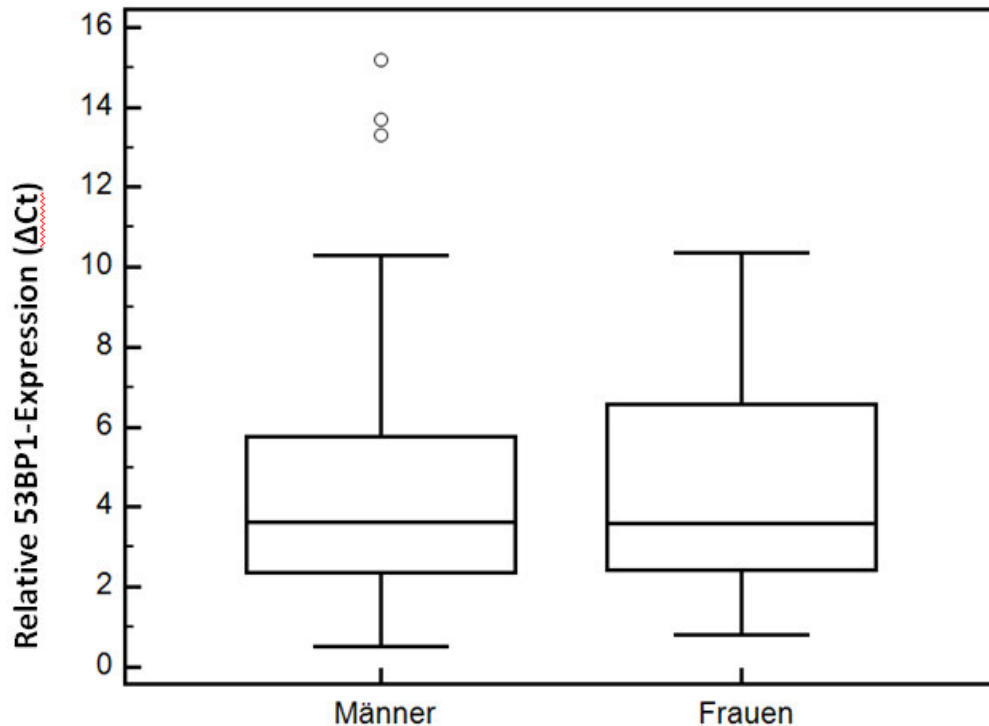


Abbildung 24: 53BP1-Expression bei beiden Geschlechtern. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

3.4.2 Unterschied zwischen Patienten höheren und geringeren Alters

Die Daten zeigen, dass mit zunehmenden Alter die 53BP1-Expression sinkt ($p=0,03$, Spearman's correlation).

3.4.3 Unterschied des OS zwischen niedrig- und hochexprimierenden ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen

Unter den Patienten der ESPATÜ-Studie, die ein Nicht-Adenokarzinom hatten (adenosquamoses, großzelliges oder Plattenepithelkarzinom), ergaben die Daten einen signifikanten Unterschied ($p=0,02$, Tabelle 16, Abbildung 25) in der Dauer des OS zwischen Patienten, die dieses Gen hoch- (Median 39 Monate) und denen die es niedrig (Median 16 Monate) exprimierten.

Tabelle 16: OS der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen mit hoher und niedriger 53BP1-Expression (Kaplan-Meier Kurve)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	6	29
Mediane Überlebenszeit	16	39
Signifikanz	p=0,0166	
Hazard ratio	0,3508	
95% Konfidenzintervall	0,09495 bis 1,2959	

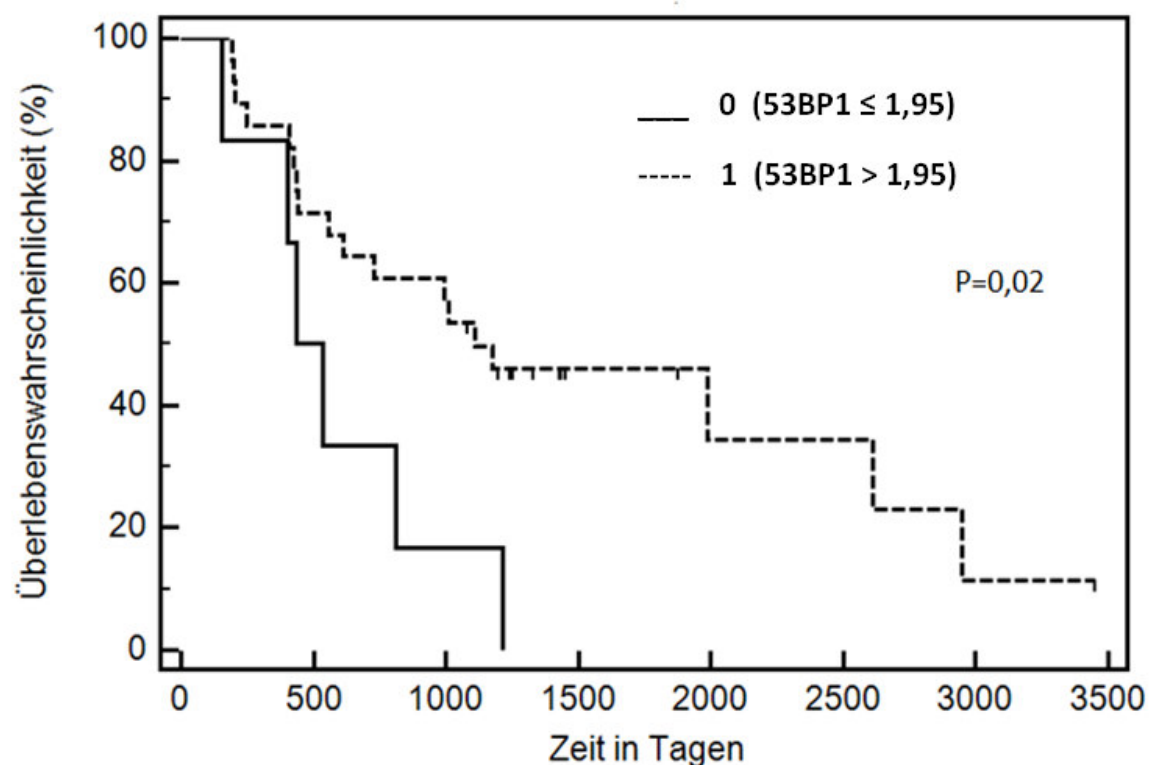


Abbildung 25: Overall survival der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen mit hoher und niedriger 53BP1-Expression. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens.

3.4.4 Unterschied des PFS zwischen niedrig- und hochexprimierenden ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen

Auch das PFS zeigte einen signifikanten Unterschied ($p=0,03$, Tabelle 17, Abbildung 26) zwischen ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen, die eine hohe (Median 33,1 Monate) und eine niedrige (Median 11,6 Monate) 53BP1-Expression aufwiesen. Die Patienten mit einer hohen Expression profitierten von einer längeren Zeit ohne Krankheitsprogression.

Tabelle 17: PFS der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen je nach Höhe der 53BP1-Expression (Kaplan-Meier Kurve)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	6	29
Mediane Überlebenszeit	11,6	33,1
Signifikanz	p=0,025	
Hazard ratio	0,3694	
95% Konfidenzintervall	0,1027 bis 1,3293	

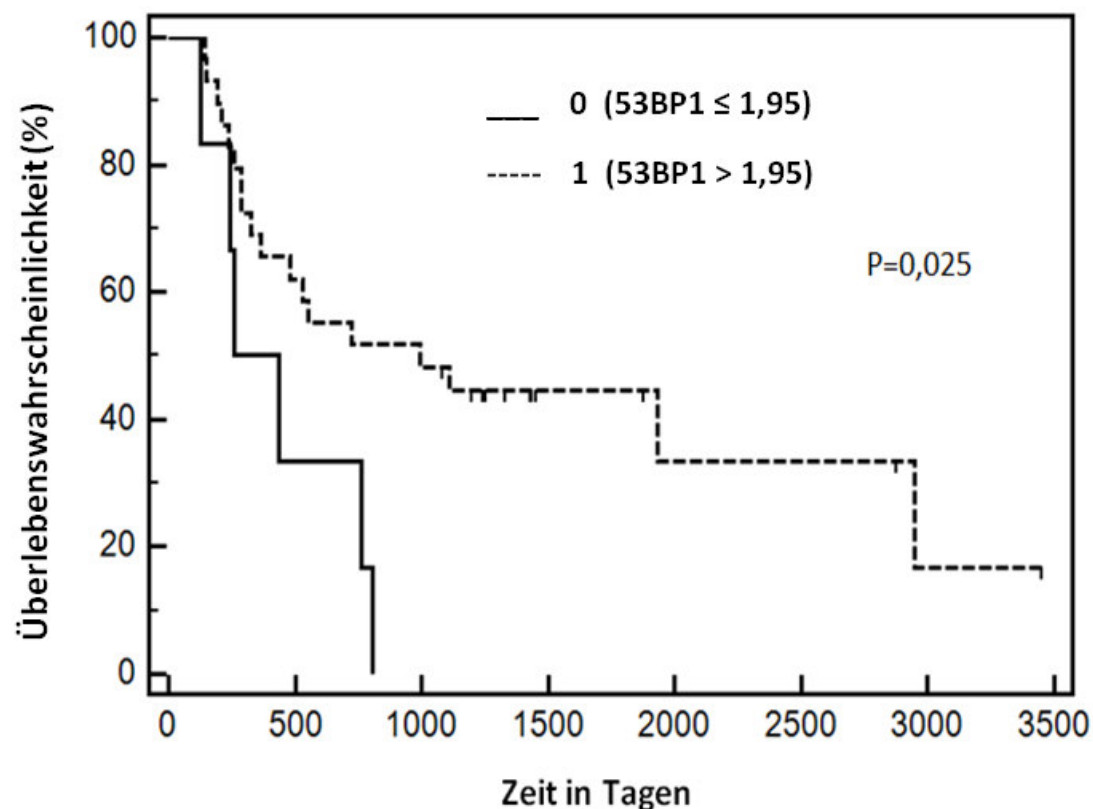


Abbildung 26: Progression free survival der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen je nach Höhe der 53BP1-Expression. Die Patienten mit einer hohen Expression haben ein signifikant längeres PFS.

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur 53BP1-mRNA-Expression

Die 53BP1-Expression bot, sowohl in der gesamten Patientengruppe, als auch unter den ESPATÜ-Studienpatienten allein, keine Unterschiede zwischen Tumoren verschiedener Histologien (siehe im Anhang Abbildung 43). Frauen und Männer exprimierten dieses Gen gleich stark, jedoch ergaben die Daten, dass ältere Patienten eine signifikant niedrigere Expression aufwiesen. In der Patientensubgruppe mit Nicht-Adenokarzinomen der ESPATÜ-Studie war eine hohe 53BP1-

Expression mit einem klaren Gesamtüberlebensvorteil und einer längeren progressionsfreien Überlebenszeit vergesellschaftet.

3.5 Analyse der RAP80-mRNA-Expression

Die Höhe der RAP80-mRNA-Expression konnte bei 77 der 100 Patienten durch RT-PCR bestimmt werden.

3.5.1 Unterschied zwischen beiden Geschlechtern

Zwischen Männern und Frauen war kein Unterschied ($p=0,61$, Tabelle 18, Abbildung 27) in der RAP80-Expression zu eruieren.

Tabelle 18: RAP80-Expression bei Männern und Frauen (Mann-Whitney-U Test)

RAP80-mRNA-Expression	Frauen	Männer
Stichprobenzahl	22	55
Niedrigster Wert	0,63	0,4
Höchster Wert	8,13	11,03
Median	1,98	2,19
95% Konfidenzintervall für den Median	1,3497 bis 3,4056	1,9100 bis 2,7295
Zweiseitige Wahrscheinlichkeit	p = 0,6158	

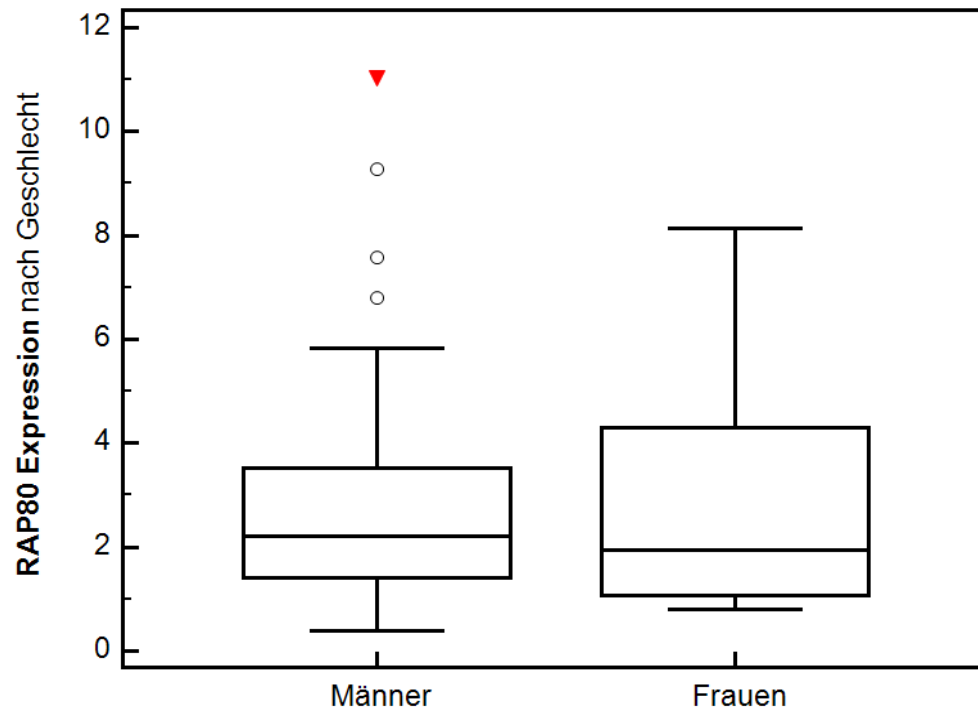


Abbildung 27: RAP80-Expression bei Männern und Frauen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Geschlechtern.

3.5.2 Unterschied des PFS zwischen niedrig- und hochexprimierenden ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen

Es waren bei den ESPATÜ-Patienten (Nicht-Adenokarzinomen) mit hoher und niedriger Expression keine signifikanten Unterschiede ($p=0,68$, Tabelle 19, Abbildung 28) bezüglich des progressionsfreien Überlebens detektierbar.

Tabelle 19: PFS der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen (Kaplan-Meier-Kurve)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	17	27
Mediane Überlebenszeit	17	18
Signifikanz	p=0,6801	
Hazard ratio	0,8643	
95% Konfidenzintervall	0,4138 bis 1,8053	

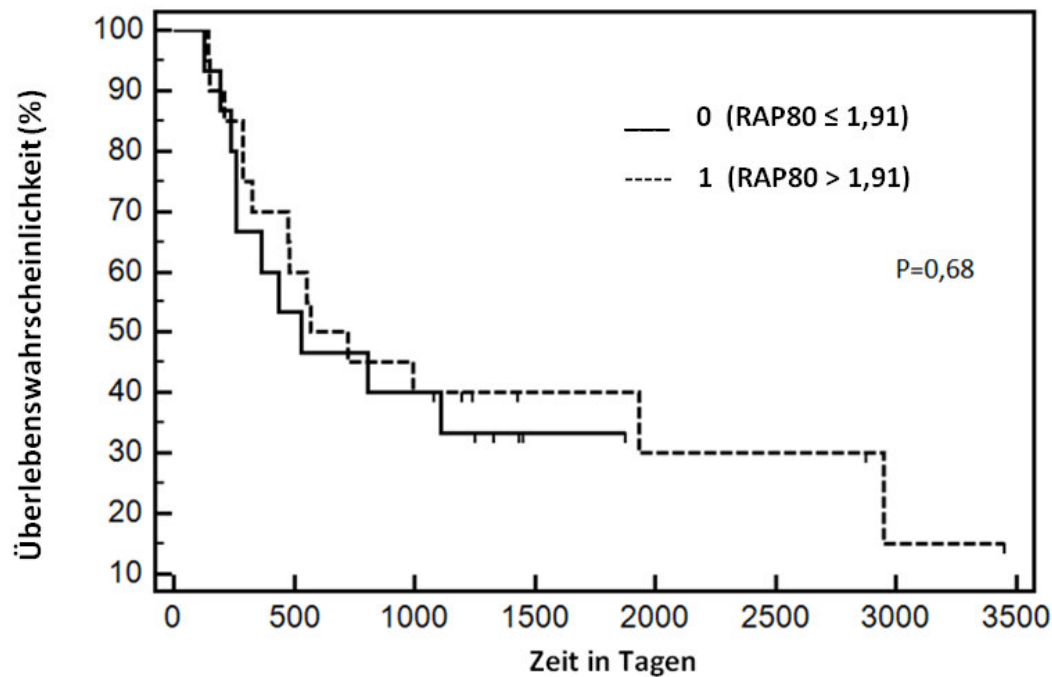


Abbildung 28: Progression free survival der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen RAP80 hoch- und niedrig exprimierenden Patienten.

3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur RAP80-mRNA-Expression

Die Expression blieb von der Histologie (siehe im Anhang Abbildung 44) und von dem Geschlecht unbeeinflusst. Darüber hinaus hatte die Höhe derselben keinen Einfluss auf das progressionsfreie Überleben bei Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen.

3.6 Gensignatur BRCA1 und RAP80

Wir konnten bei 71 der 100 Patienten die Höhe der mRNA-Expression von BRCA1 und RAP80 bestimmen. Die Kombination der Expression beider Gene bezogen auf die Überlebensparameter ergaben hochsignifikante Ergebnisse.

3.6.1 Unterschied des OS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten

Unter den ESPATÜ-Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen überlebten diejenigen signifikant länger ($p=0,01$, Tabelle 20, Abbildung 29), die sowohl BRCA1 als auch RAP80 hoch exprimierten.

Tabelle 20: OS der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen (Gensignatur BRCA1 und RAP80)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	7	12
Mediane Überlebenszeit	15	65
Signifikanz	p=0,0120	
Hazard ratio	0,2679	
95% Konfidenzintervall	0,07521 bis 0,9543	

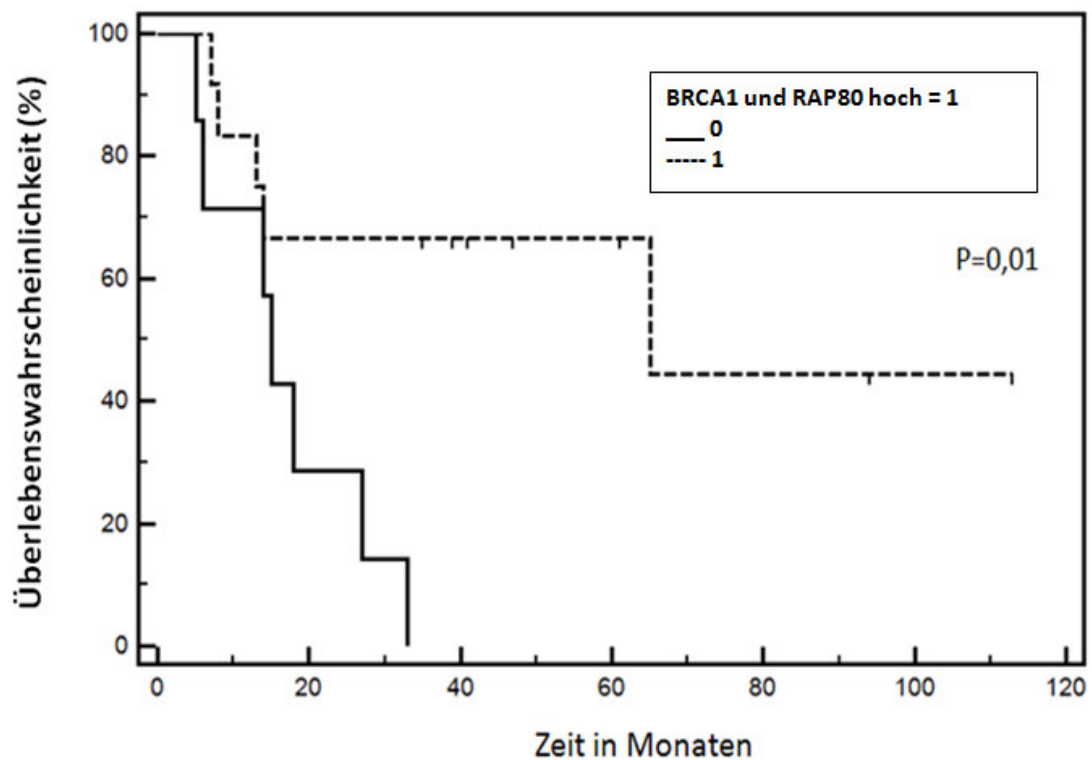


Abbildung 29: Overall survival der ESPATÜ-Studienpatienten mit Nicht-Adenokarzinomen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die RAP80 und BRCA1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

In der gesamten Studienpopulation mit Nicht-Adenokarzinomen war der Zusammenhang sogar deutlicher darzustellen, als in der Subgruppe der ESPATÜ-Patienten (p=0,006, Tabelle 21, Abbildung 30).

Tabelle 21: OS bei Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen (Gensignatur BRCA1 und RAP80)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	9	16
Mediane Überlebenszeit	15	65
Signifikanz	p=0,0061	
Hazard ratio	0,2872	
95% Konfidenzintervall	0,09521 bis 0,8664	

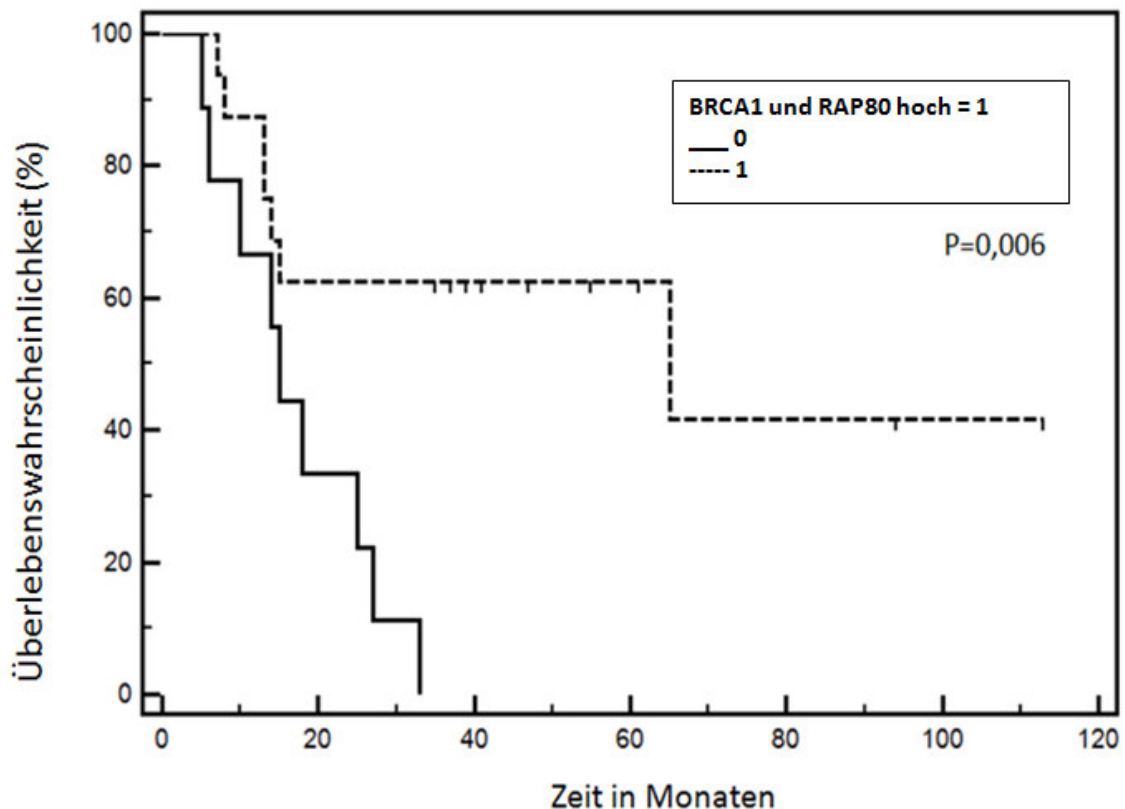


Abbildung 30: Overall survival bei Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die RAP80 und BRCA1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

3.6.2 Unterschied des PFS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten

Ähnliche Ergebnisse erhielten wir für das Progressionsfreie Überleben. Bei Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen, die sowohl BRCA1 als auch RAP80 hoch exprimierten, war das Malignom signifikant länger progressionsfrei als bei denjenigen, die beide Gene niedrig exprimierten (p=0,005, Tabelle 22 Abbildung 31).

Tabelle 22: PFS bei Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen (Gensignatur BRCA1 und RAP80)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	9	16
Mediane Überlebenszeit	9	63
Signifikanz	p=0,0049	
Hazard ratio	0,281	
95% Konfidenzintervall	0,09265 bis 0,8525	

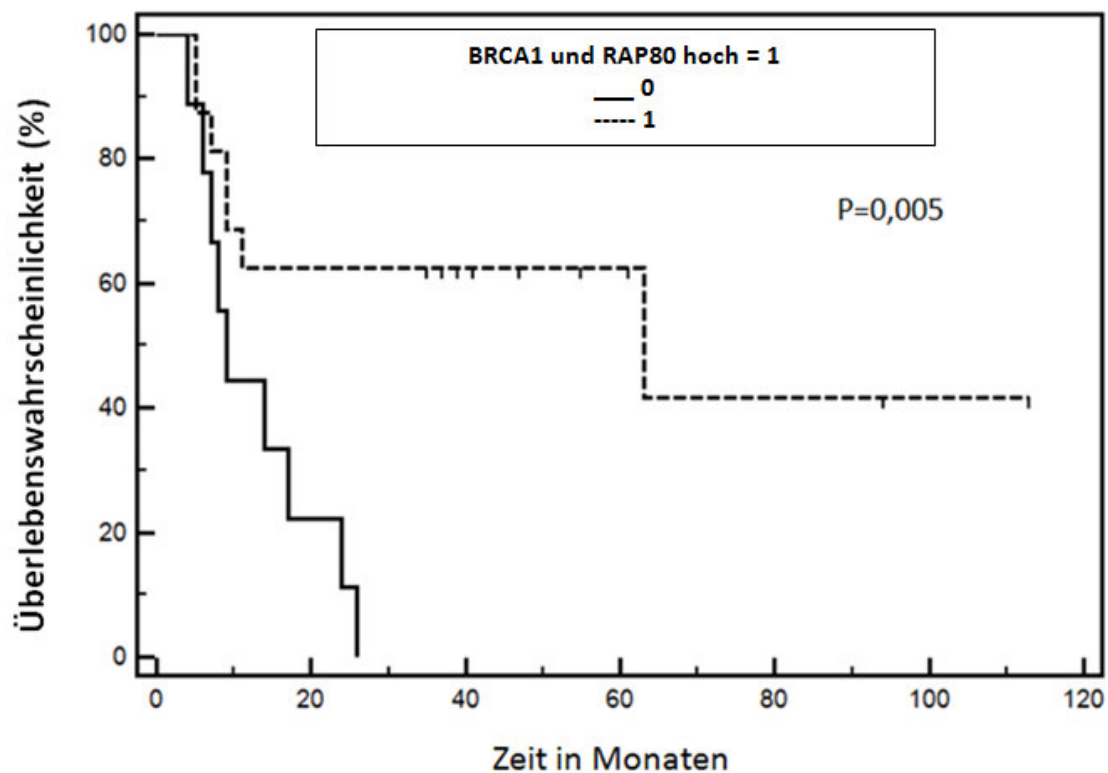


Abbildung 31: Progression free survival bei Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die RAP80 und BRCA1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

Unter Einschluss der Patienten, die ein Adenokarzinom aufwiesen zeigte sich in der ESPATÜ-Gruppe keine Signifikanz, jedoch ein Trend ($p=0,06$, Tabelle 23, Abbildung 32) und in der Gesamtstudienpopulation eine deutliche Signifikanz ($p=0,04$, Tabelle 24, Abbildung 33) für ein längeres PFS unter den Patienten, die beide Gene hoch gegenüber denen, die sie niedrig exprimierten.

Tabelle 23: PFS der ESPATÜ-Studienpatienten (Gensignatur BRCA1 und RAP80)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	13	17
Mediane Überlebenszeit	14	27
Signifikanz	p=0,0603	
Hazard ratio	0,465	
95% Konfidenzintervall	0,1945 bis 1,1116	

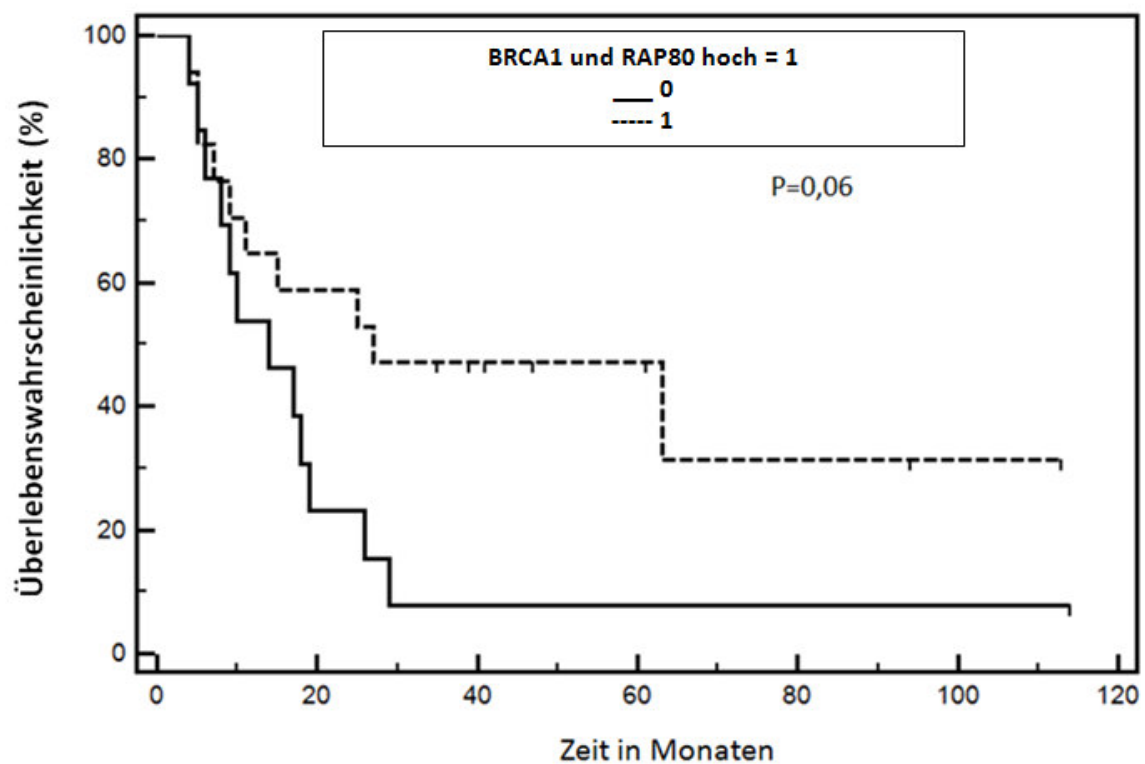


Abbildung 32: Progression free survival der ESPATÜ-Studienpatienten. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die RAP80 und BRCA1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

Tabelle 24: PFS bei allen Patienten (Gensignatur BRCA1 und RAP80)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	18	22
Mediane Überlebenszeit	14	27
Signifikanz	p=0,0426	
Hazard ratio	0,4898	
95% Konfidenzintervall	0,2352 bis 1,0200	

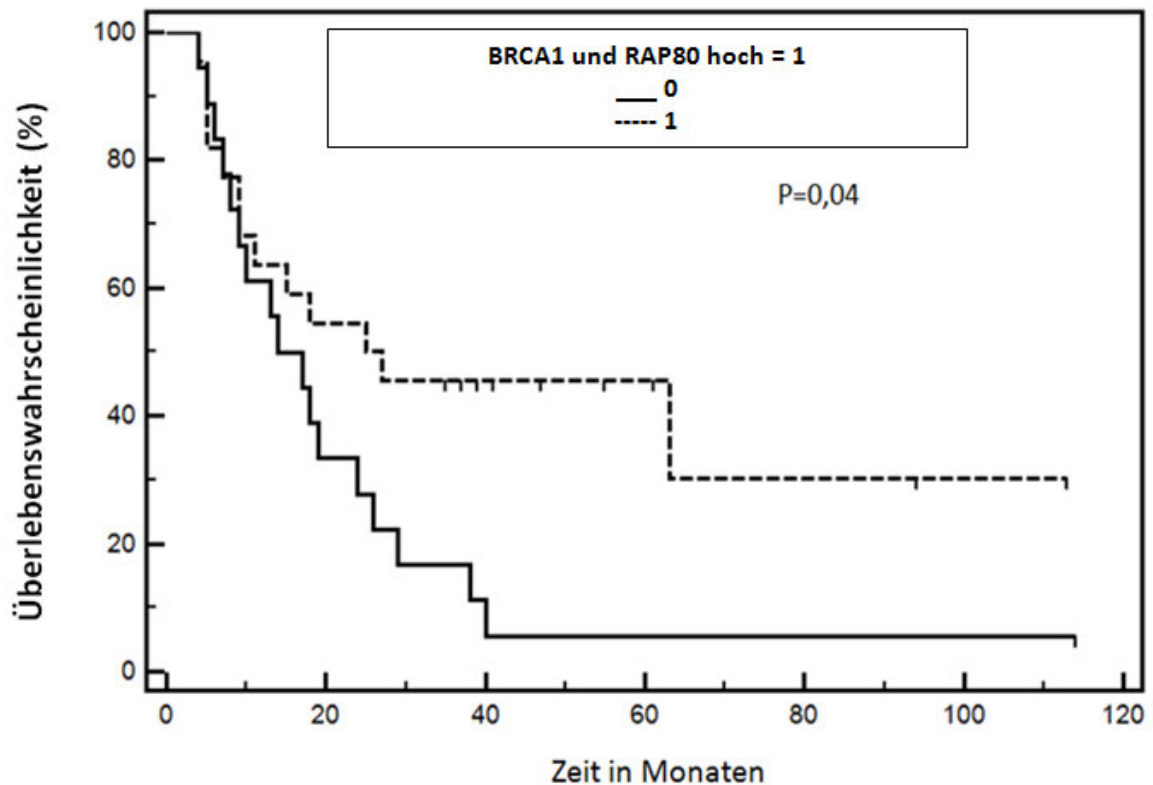


Abbildung 33: Progression free survival. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die RAP80 und BRCA1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

3.6.3 Zusammenfassung zur Gensignatur BRCA1 und RAP80

Eine simultan hohe Expression beider Gene ist ein signifikant prognostischer Marker sowohl für ein längeres OS als auch für ein längeres PFS. Beim Gesamtüberleben gilt dies für die Nicht-Adenokarzinome und auch in Bezug auf das PFS kommt es bei dieser histologischen Gruppe zu einer deutlicheren Signifikanz als unter Einschluss aller Tumorentitäten.

3.7 Gensignatur BRCA1 und 53BP1

Die Höhe der mRNA-Expression von BRCA1 und 53BP1 konnte mittels RT-PCR bei 72 von den 100 Patienten ermittelt werden. Auch diese Gensignatur korrelierte hochsignifikant mit den Überlebensparametern unserer Patienten.

3.7.1 Unterschied des OS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten

Die Patienten, die ein Nicht-Adenokarzinom hatten und sowohl BRCA1 als auch 53BP1 hoch exprimierten zeigten ein hoch signifikant längeres OS als diejenigen, die beide Gene niedrig exprimierten ($p=0,003$, Tabelle 25, Abbildung 34).

Tabelle 25: OS der Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen (Gensignatur BRCA1 und 53BP1)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	6	17
Mediane Überlebenszeit	13,5	65
Signifikanz	$p=0,0030$	
Hazard ratio	0,2359	
95% Konfidenzintervall	0,05515 bis 1,0091	

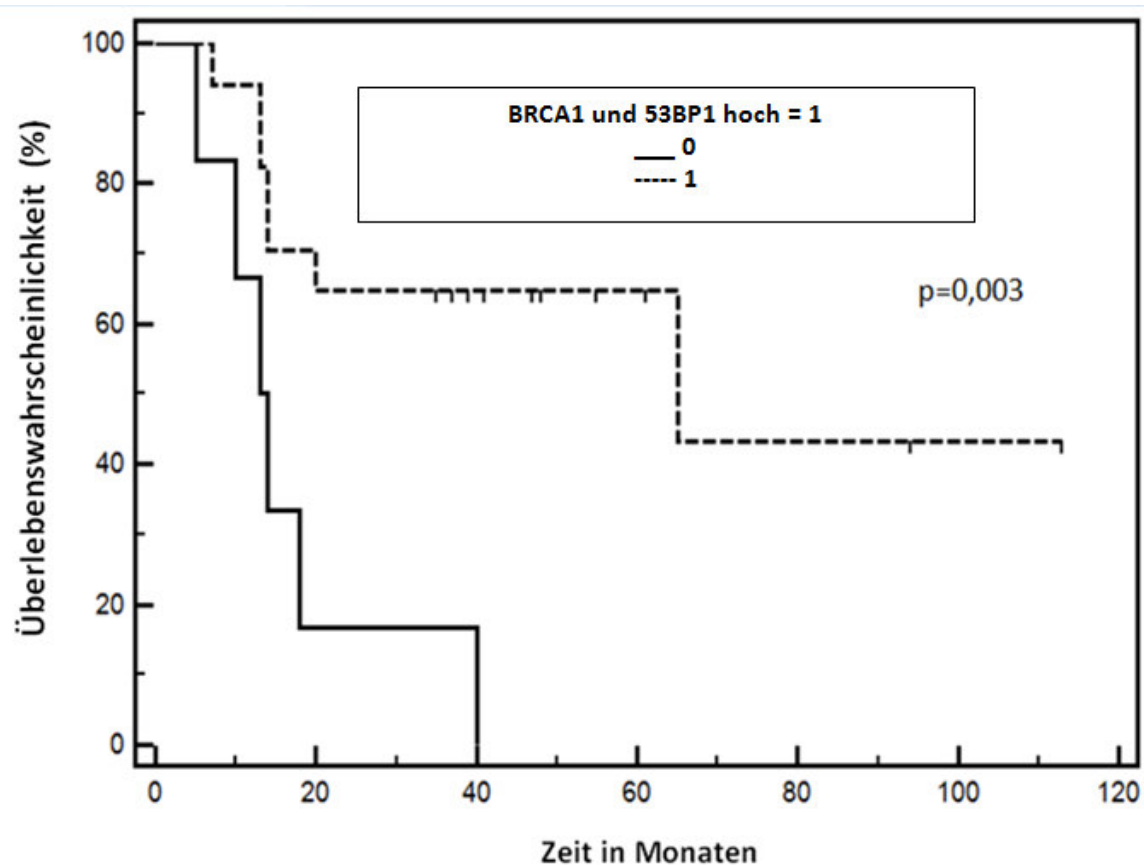


Abbildung 34: Overall survival der Patienten mit Nicht-Adenokarzinomen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die BRCA1 und 53BP1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

Schluss man auch die Patienten ein, die ein Adenokarzinom aufwiesen, folgten ähnliche Ergebnisse: Der Vergleich von hoch und niedriger Expression von BRCA1 und 53BP1 unter den ESPATÜ-Patienten allein zeigte eine Signifikanz von $p=0,04$ (Tabelle 26, Abbildung 35), und die Analyse in der gesamten Gruppe ergab ein p -Wert von 0,055 (Trend) (Tabelle 27, Abbildung 36). Ein klarer Überlebensvorteil zeigt sich für die Patienten mit hoher Expression beider Gene.

Tabelle 26: OS bei den ESPATÜ-Patienten (Gensignatur BRCA1 und 53BP1)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	9	19
Mediane Überlebenszeit	15	65
Signifikanz	$p=0,0437$	
Hazard ratio	0,3978	
95% Konfidenzintervall	0,1348 bis 1,1739	

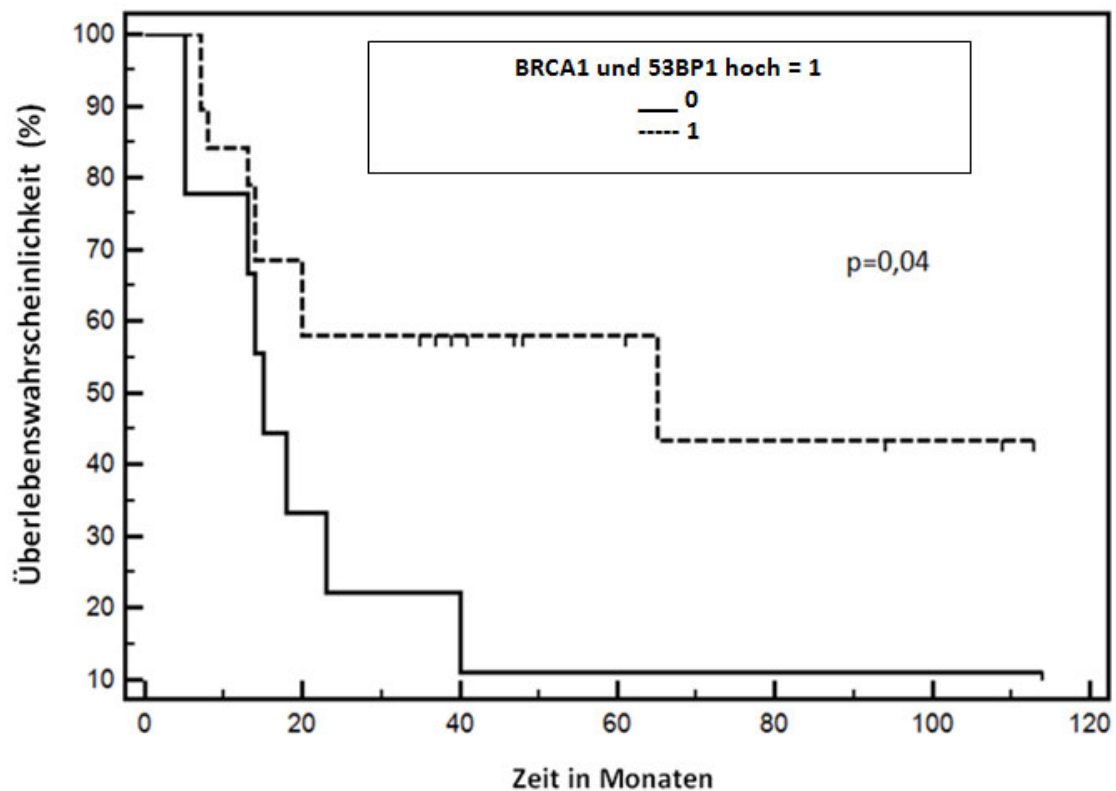


Abbildung 35: Overall survival bei den ESPATÜ-Patienten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die BRCA1 und 53BP1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

Tabelle 27: OS bei allen Patienten (Gensignatur BRCA1 und 53BP1)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	11	23
Mediane Überlebenszeit	15	65
Signifikanz	p=0,0552	
Hazard ratio	0,4422	
95% Konfidenzintervall	0,1639 bis 1,1926	

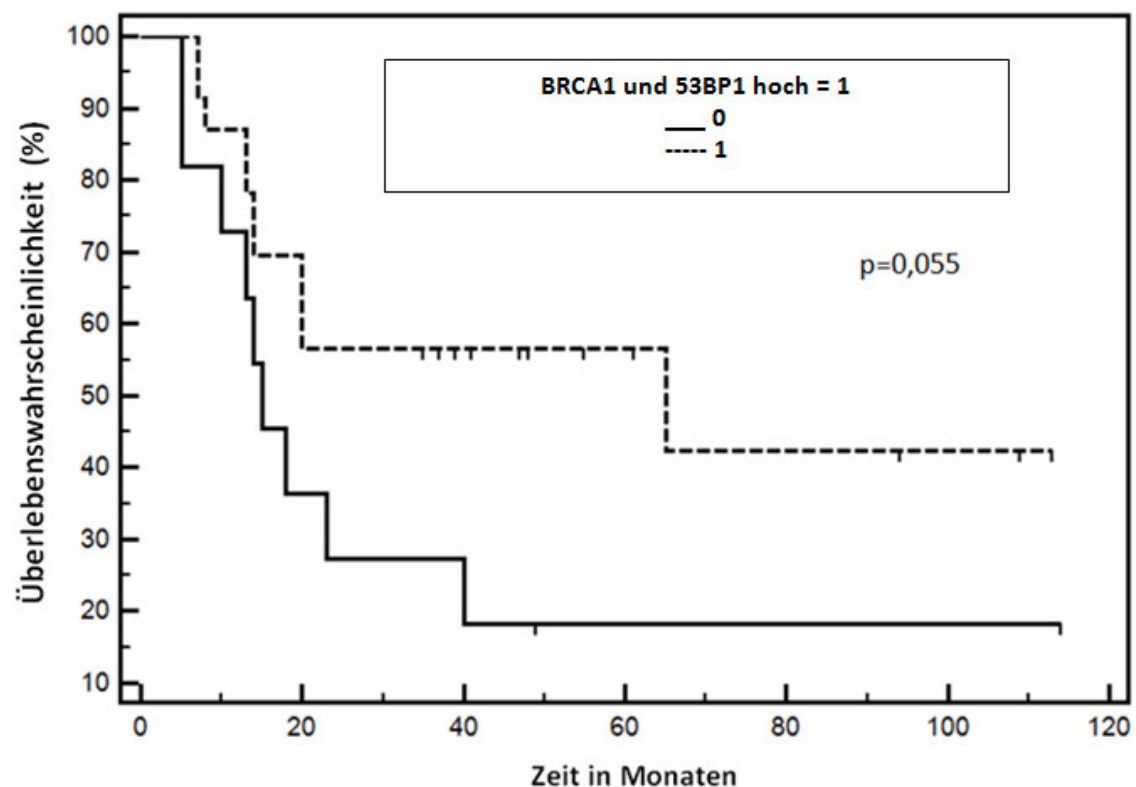


Abbildung 36: Overall survival bei allen Patienten. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (nur ein Trend) zwischen Patienten, die BRCA1 und 53BP1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

3.7.2 Unterschied des PFS zwischen hoch- und niedrigexprimierenden Patienten

Verglich man die Patienten unserer Studie, die BRCA1 und 53BP1 hoch mit denen, die diese beiden Gene niedrig exprimierten, hatten diejenigen mit hoher Expression ein längeres PFS als jene mit niedriger Expression (p=0,04, Tabelle 28, Abbildung 37).

Tabelle 28: PFS bei allen Patienten (Gensignatur BRCA1 und 53BP1)

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	0	1
Stichprobengröße	11	23
Mediane Überlebenszeit	9	27
Signifikanz	p=0,0408	
Hazard ratio	0,4485	
95% Konfidenzintervall	0,1759 bis 1,1434	

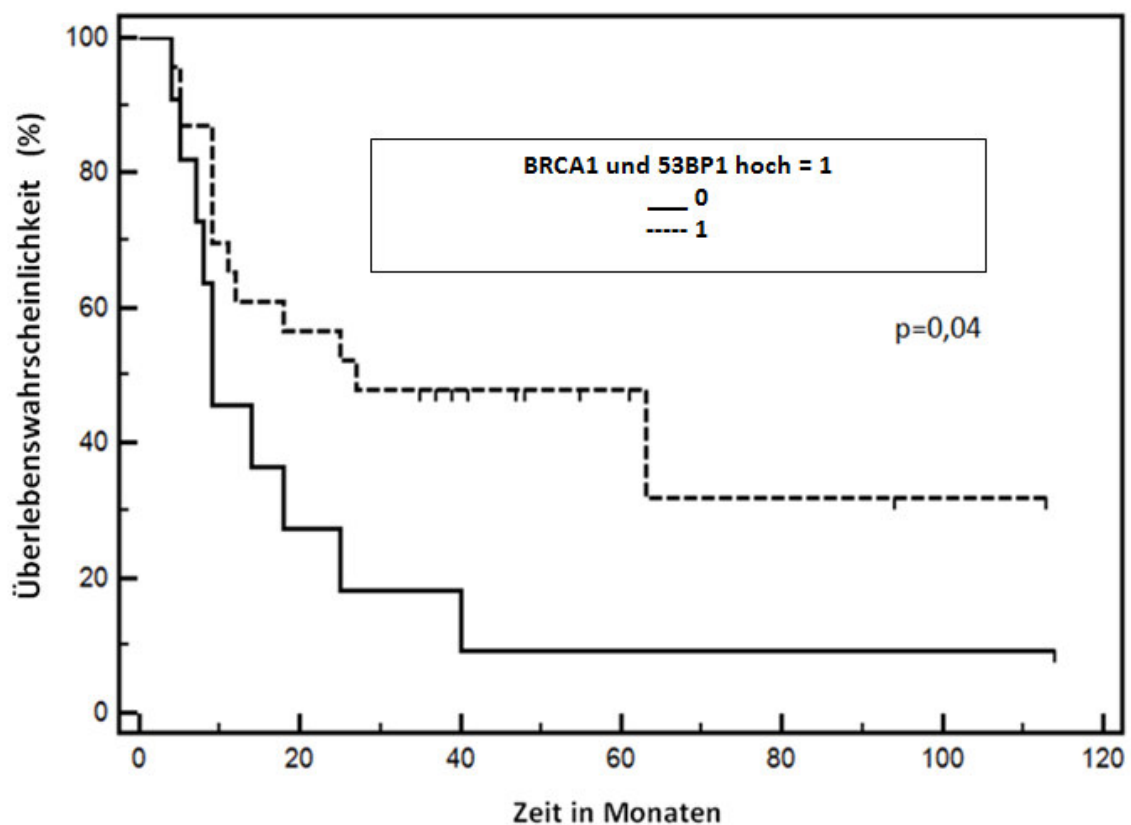


Abbildung 37: Progression free survival bei allen Patienten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die BRCA1 und 53BP1 hoch und denen, die beide Gene niedrig exprimieren.

3.7.3 Zusammenfassung zur Gensignatur BRCA1 und 53BP1

Wenn die Patienten beide Gene hoch exprimierten, war deren Gesamt- und progressionsfreie Überlebenszeit signifikant länger, als bei simultan niedriger Genexpression. Unter Ausschluss der Adenokarzinome zeigte sich auch hier eine Zunahme dieser Signifikanz.

3.8 Korrelation der histologischen Tumorentität mit dem Outcome

3.8.1 Gesamtkollektiv

Die Histologie beeinflusste nicht das Gesamtüberleben in unserer Studiengruppe ($p=0,5$, siehe Tabelle 29, Abbildung 38). Doch Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom hatten ein signifikant längeres PFS ($p=0,045$, siehe Tabelle 30, Abbildung 39).

Tabelle 29: Zusammenhang Histologie und OS im Gesamtkollektiv

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	Adenokarzinome	Plattenepithelkarzinome	Gesamt
Stichprobengröße	43	43	86
Mediane Überlebenszeit	20	28	24
Signifikanz	p=0,5218		
Hazard ratio	0,8537		
95% Konfidenzintervall	0,5205 bis 1,4004		

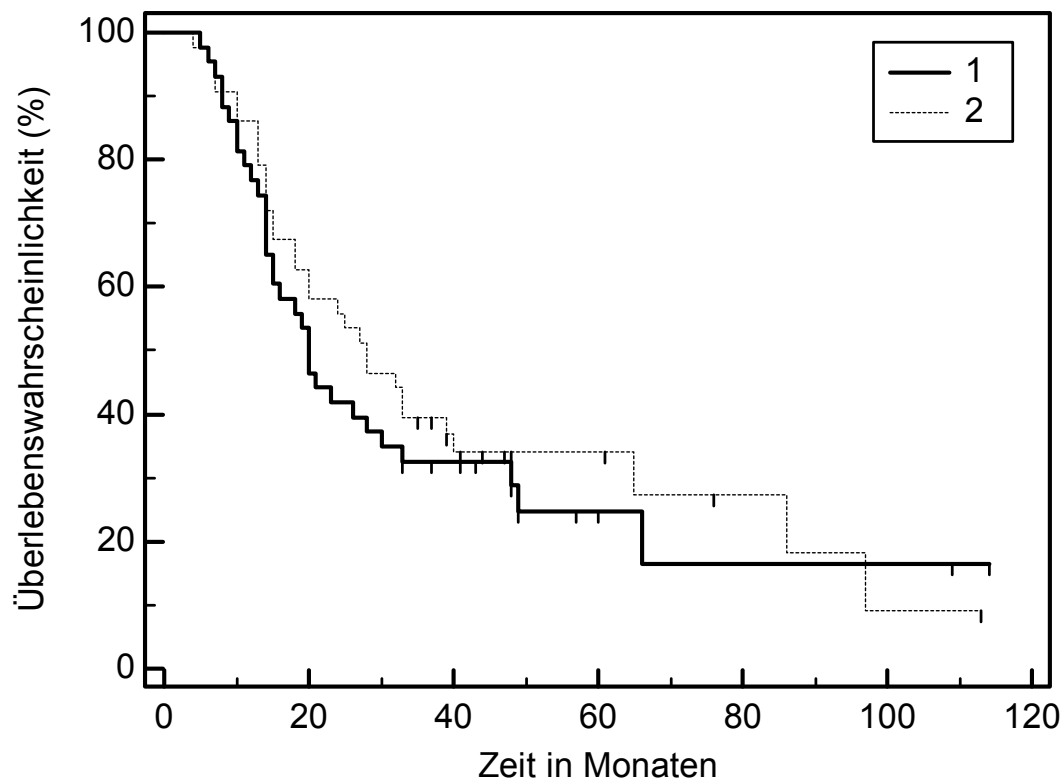


Abbildung 38: Zusammenhang Histologie und OS im Gesamtkollektiv. 1: Adenokarzinome, 2: Plattenepithelkarzinome

Tabelle 30: Zusammenhang Histologie und PFS im Gesamtkollektiv

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	Adenokarzinome	Plattenepithelkarzinome	Gesamt
Stichprobengröße	43	43	86
Mediane Überlebenszeit	10	16	14
Signifikanz	p=0,0489		
Hazard ratio	0,6393		
95% Konfidenzintervall	0,4016 bis 1,0177		

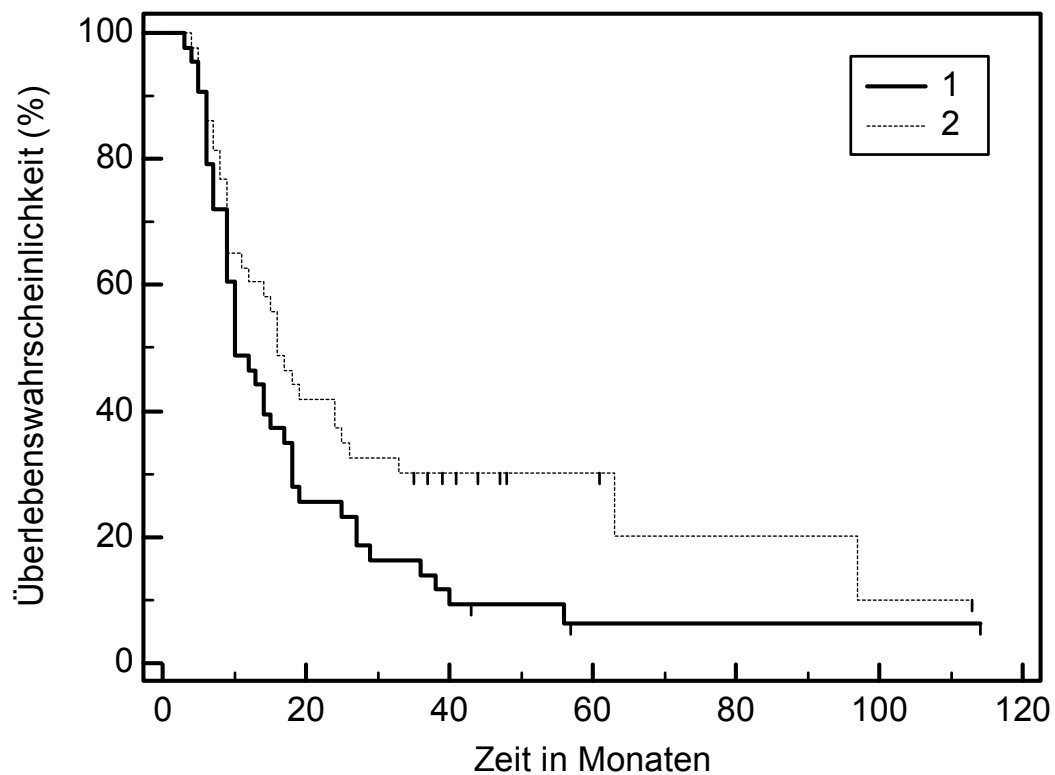


Abbildung 39: Zusammenhang Histologie und PFS im Gesamtkollektiv, 1: Adenokarzinome, 2: Plattenepithelkarzinome

3.8.2 ESPATÜ-Studienpatienten

Unter den ESPATÜ-Studienpatienten hatte die Histologie weder einen Einfluss auf das OS ($p=0,87$, siehe Tabelle 31, Abbildung 40) noch auf das PFS ($p=0,27$, siehe Tabelle 32, Abbildung 41).

Tabelle 31: Zusammenhang Histologie und OS bei den ESPATÜ-Patienten

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	Adenokarzinome	Plattenepithelkarzinome	Gesamt
Stichprobengröße	25	36	61
Mediane Überlebenszeit	30	33	32
Signifikanz	p=0,8735		
Hazard ratio	1,0506		
95% Konfidenzintervall	0,5689 bis 1,9403		

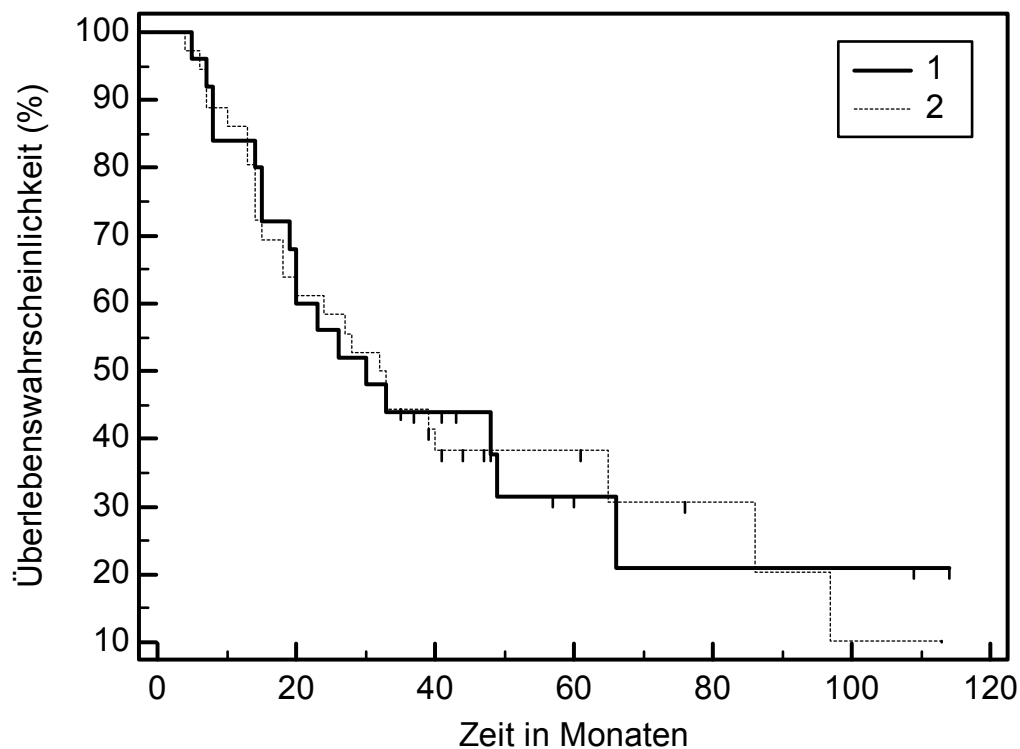


Abbildung 40: Zusammenhang Histologie und OS bei den ESPATÜ-Patienten, 1: Adenokarzinome, 2: Plattenepithelkarzinome

Tabelle 32: Zusammenhang Histologie und PFS bei den ESPATÜ-Patienten

Vergleich der Überlebenskurven (Logrank Test)	Adenokarzinome	Plattenepithelkarzinome	Gesamt
Stichprobengröße	25	36	61
Mediane Überlebenszeit	17	18	17
Signifikanz	p=0,2837		
Hazard ratio	0,7394		
95% Konfidenzintervall	0,4134 bis 1,3225		

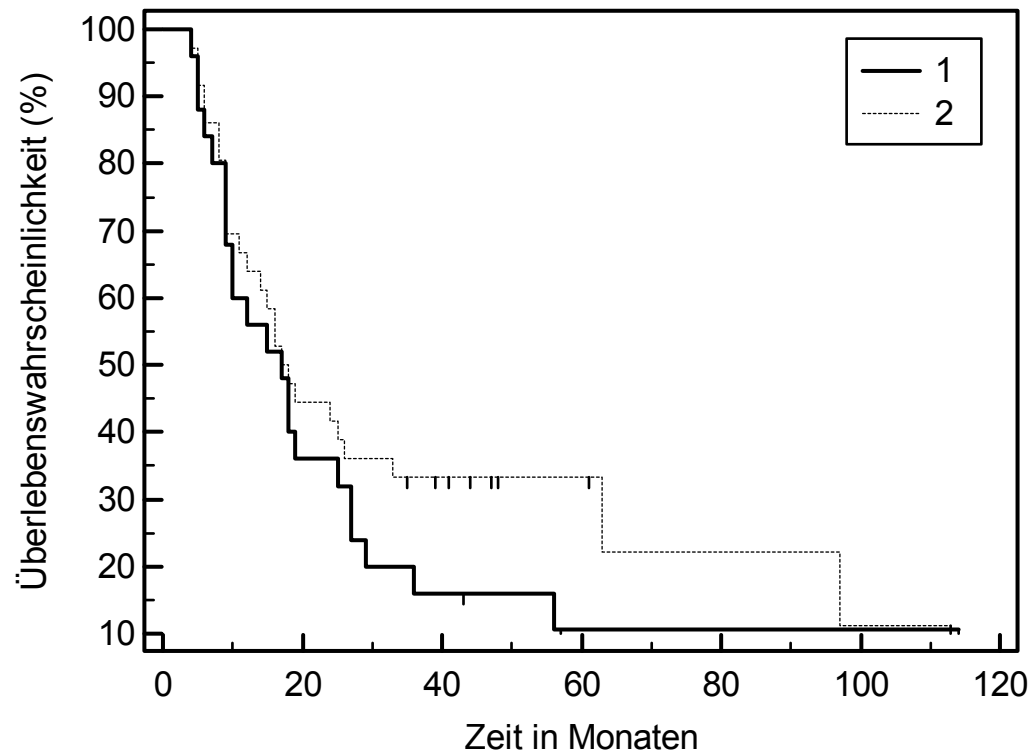


Abbildung 41: Zusammenhang Histologie und PFS bei den ESPATÜ-Patienten, 1: Adenokarzinome, 2: Plattenepithelkarzinome

4 Diskussion

Die multimodale Behandlung von Patienten mit lokal-fortgeschrittenem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom im Stadium IIIA und selektiv im Stadium IIIB ist eine kurativ intendierte Therapie mit 5-Jahresüberlebensraten von 15 bis 40%, je nach individueller Risikokonstellation der Patienten (Auperin et al., 2010; Curran et al., 2011; Eberhardt et al., 2015; Eberhardt et al., 2015). Als Standardtherapie gilt, unter anderem aufgrund der Ergebnisse der Essener Arbeitsgruppe, die kombinierte, simultane Chemostrahlentherapie mit oder ohne kurative Resektion (Albain et al., 2009; Auperin et al., 2010; Curran et al., 2011; Eberhardt et al., 1998; Eberhardt et al., 2015; Eberhardt et al., 2013; Eberhardt et al., 2015). So zeigen die aktuell publizierten Langzeitergebnisse der prospektiv-randomisierten, multizentrischen, deutschen Phase-III Studie ESPATÜ zur multimodalen Therapie im Stadium III in beiden Randomisationsarmen, einerseits mit präoperativer Chemostrahlentherapie gefolgt von Resektion (Arm B) und andererseits mit definitiver Boost-Chemostrahlentherapie bis 65-71 Gy (Arm A), sehr günstige und vergleichbare 5-Jahres-Überlebensraten über 40% (Eberhardt et al., 2015). Zwischen beiden Armen konnte kein signifikanter Unterschied sowohl im OS als auch im PFS gezeigt werden (Eberhardt et al., 2015). Neben den bekannten Prognosefaktoren Stadium, Allgemeinzustand und Gewichtsverlust bei Diagnosestellung sind bislang keine klaren, prospektiv validierten Prognosefaktoren bekannt, die helfen könnten, die Therapie des einzelnen Patienten rational zu individualisieren (Albain et al., 1991; Eberhardt et al., 2013; Goldstraw et al., 2007; Stanley, 1980). Der Suche nach prognostischen und insbesondere prädiktiven Biomarkern kommt deshalb in Zukunft für das Stadium III des NSCLC in dieser Behandlungssituation eine zunehmende klinische Bedeutung zu.

Wir konnten in der vorliegenden Untersuchung der mRNA-Expression von BRCA1 und 53BP1 an 100 Patienten eine signifikante Assoziation mit dem PFS und dem OS der Patienten nachweisen. Dabei konnten wir die Genexpressionsdaten mittels einer Trennpunktanalyse in Gruppen mit hoher und niedriger Expression unterteilen. In einem weiteren Schritt fassten wir jeweils Gruppen zweier Marker zusammen und konnten so aufzeigen, dass eine Kombination von zwei Genen einer Einzelgen-Messung überlegen sein könnte. Unsere Ergebnisse legen somit nahe, dass die prätherapeutische Messung der DNA-Reparaturgene BRCA1 und 53BP1 beim lokal-fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom als Prognosemarker nutzbar sein könnte. Hervorzuheben scheint die Korrelation von Histologie und Expressionsprofil von BRCA1. So ist die Expression der BRCA1-mRNA beim Adenokarzinom im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom und Großzelligen Karzinom deutlich niedriger (siehe Abbildung 19, Seite 44). Unklar ist, welche Konsequenz dieses Ergebnis für die zukünftigen Behandlungskonzepte beim NSCLC im Stadium III

haben könnte, insbesondere ob die systemisch-zytotoxischen Therapiestrategien im Stadium III bezogen auf die unterschiedlichen Histologien getrennt weiterentwickelt werden müssen.

4.1 Vergleich histologischer Subgruppen

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich ein Zusammenhang der BRCA1-mRNA-Expression mit der Histologie der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome. So exprimierten die Plattenepithelkarzinome BRCA1 im Schnitt höher als Adenokarzinome. Auch Papadaki und seine Kollegen kamen zu vergleichbaren Ergebnissen (Papadaki et al., 2011). Solche Unterschiede in der Expression nach histologischen Subtypen fanden sich nicht bei 53BP1 und RAP80. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass die Prognose der Plattenepithelkarzinome bezüglich Gesamtüberleben und Progressions-freiem Überleben unter vergleichbarer Therapie günstiger als diejenige der Adenokarzinome ist (Eberhardt et al., 2013; Pöttgen et al., 2013). Auch im hier untersuchten Kollektiv hatten Patienten mit Plattenepithelkarzinomen ein längeres PFS als diejenigen mit Adenokarzinomen. Ob die unterschiedliche Expression von BRCA1 im Tumorgewebe ein Surrogat für diese Unterschiede darstellt oder es sich um einen mechanistischen Zusammenhang handelt, kann aus den hier vorliegenden korrelativen Analysen nicht beantwortet werden.

4.2 BRCA1

In-vitro und in-vivo Untersuchungen zum Genprodukt von *BRCA1* konnten nachweisen, dass eine hohe *BRCA1*-Expression eine Sensibilisierung gegenüber Mitosehemmstoffen (Vinka-Alkaloiden bzw. Taxanen) und eine Resistenz gegenüber Platinderivaten („alkylierende Zytostatika“) bewirken kann (Boukovinas et al., 2008; Husain et al., 1998; James et al., 2007; Mullan et al., 2006). *BRCA1* vermittelt den Zellzyklusarrest in der G(2)- und M-Phase und, je nach untersuchtem Wirkstoff und Art des Zellschadens, kann es die Apoptose der Tumorzelle induzieren oder inhibieren (Quinn et al., 2003). Die Rolle von *BRCA1* bei der Reparatur von DNA-Addukten, -Quervernetzungen (NER) und Doppelstrangbrüchen (HR) könnte die Resistenz gegenüber Platinderivaten erklären, die solche DNA-Schäden typischerweise hervorrufen. Es ist nicht in allen Einzelheiten klar, warum eine hohe *BRCA1*-Expression eine bessere therapeutische Antwort auf Taxane mit sich bringt, folgende Faktoren könnten jedoch damit zusammenhängen: *BRCA1* (1) induziert die Apoptose nach Einwirkung durch Taxane (Zhao et al., 2014), (2) reguliert die

Aktivierung des Checkpoints und führt zum Zellzyklusarrest während der Ausbildung des Spindelapparates, beides essentielle Prozesse für die Sensitivität von Taxanen (Chabali et al., 2006; Sudo et al., 2004). Ferner stabilisiert BRCA1 die Mikrotubuli durch Interaktion mit Zentrosom-Proteinen (De Ligo et al., 2009).

Das Therapieregime unseres Patientenkollektivs bestand aus Mitosehemmstoffen einerseits (Paclitaxel bzw. Vinorelbin) und der alkylierenden Substanz Cisplatin andererseits. Wir konnten nachweisen, dass Patienten mit einer hohen BRCA1-mRNA-Expression (über der 60. Perzentile) signifikant günstigere OS und PFS hatten. Dies lässt auf eine dominante Rolle der Taxane bzw. des Vinka-Alkaloides Vinorelbin gegenüber dem Cisplatin in Bezug auf die Auswirkungen von BRCA1 schließen. Dies könnte weiterhin erklären, warum andere Untersucher, deren NSCLC-Patienten nicht systemisch mit Taxanen behandelt wurden, zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen konnten (Taron et al., 2004).

Insgesamt haben acht Arbeiten die prognostischen Einflüsse der BRCA1 mRNA- oder Protein-Expression beim (lokal) fortgeschrittenen NSCLC untersucht. Eine gemeinsame Bewertung der vorliegenden Ergebnisse wird allerdings durch die gewählten unterschiedlichen Patientenkollektive und differenten systemischen Behandlungsprotokolle sowie Quantifizierungsmethoden der klinischen Therapiestudien erschwert.

Tabelle 33: Arbeiten, die den Einfluss der BRCA1-Expression auf die Prognose untersuchten

Untersucher und Jahr	Patienten (n)	Stadium	Therapie	Tumormaterial und mRNA-/Protein-Quantifizierung	Ergebnis
Zhao et al (Zhao et al., 2014)	214	Fortgeschritten (IIIB oder IV)	Cis- oder Carboplatin + Gemcitabin, Vinorelbin oder Paclitaxel	Paraffin-eingebettetes Tumormaterial, Bestimmung der mRNA-Expressionshöhe durch RT-PCR	Hohes BRCA1-Expressionsniveau ist mit besserem Therapieansprechen und niedrigem Progressions- und Todesrisiko assoziiert
Liang et al (Liang et al., 2014)	377	Fortgeschritten (IIIB oder IV)	Cis- oder Carboplatin + Gemcitabin, Vinorelbin	Periphere mononukleäre Blutzellen, Bestimmung der mRNA-	Hohes BRCA1 ist mit besserem Therapieansprechen,

			oder Paclitaxel	Expressionshöhe durch RT-PCR	längerem PFS und OS assoziiert
Tiseo (Tiseo et al., 2013)	110	Lokal fortgeschritten oder fortgeschritten (III oder IV)	Randomisierung mit/ohne Platin (Gem+Cispl, Gem+Vinor, Gem+Cispl+I fosf, Gem+ Vinor+Ifosf)	Paraffin-eingebettetes Tumormaterial, Bestimmung der mRNA- Expressionshöhe durch Immunhistochemie	Hohes BRCA1 ist tendentiell mit einem besseren Outcome (besseres Ansprechen, PFS und OS) assoziiert, ohne statistische Signifikanz. Kein Zusammenhang mit der applizierten Therapie
Pierceall (Pierceall et al., 2012)	769	Stadium I- III	Keine Therapie oder adjuvant Cisplatin	Bestimmung der Proteinexpression durch Immunhistochemie	BRCA1 hat keine signifikante Korrelation mit dem Outcome
Taron (Taron et al., 2004)	55	Stadium IIB, IIIA und IIIB	Neoadjuvant Gemcitabin + Cisplatin gefolgt von Operation	Paraffin-eingebettetes Primärtumormaterial, Bestimmung der mRNA- Expressionshöhe durch RT-PCR	Niedriges BRCA1 ist mit besserem Ansprechen, OS und niedrigem Todesrisiko assoziiert
Papadaki (Papadaki et al., 2011)	131	Fortgeschritten (IIIB oder IV)	Docetaxel + Gemcitabin oder Docetaxel + Cisplatin	Paraffin-eingebettetes Primärtumormaterial, Bestimmung der mRNA- Expressionshöhe durch RT-PCR	Hohes BRCA1 ist mit einem besseren PFS assoziiert, keine Korrelation mit dem OS.
Boukovinas (Boukovinas et al., 2008)	102	Fortgeschritten (IIIB oder IV)	Gemcitabin + Docetaxel, zum Teil 2nd line Behandlung mit Cisplatin	Paraffin-eingebettetes Primärtumormaterial, Bestimmung der mRNA- Expressionshöhe durch RT-PCR	Hohes BRCA1 ist mit besserem Ansprechen, längerem PFS und OS assoziiert Niedriges BRCA1 unter den mit Cisplatin behandelten ist mit längerem PFS assoziiert.

Wachters (Wachters et al., 2005)	33	III und IV	Cisplatin + Gemcitabin oder Epirubicin + Gemcitabin	Bestimmung der Proteinexpression durch Immunhistochemie	Keine Korrelation mit Ansprechen und OS
-------------------------------------	----	------------	---	--	--

Da unsere Patienten im Rahmen der multimodalen Behandlung eine simultane Chemostrahlentherapie erhielten, muss auch auf eine mögliche Interaktion zwischen der BRCA1-mRNA-Expression und der Effektivität der Strahlentherapie hingewiesen werden. Ionisierende Strahlung verursacht Doppelstrangbrüche, worin primär ihre zytostatische Wirkung besteht (Vignard et al., 2013). Dieser Wirkungsmechanismus lässt eine Zunahme der Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung mit steigender BRCA1-Expression vermuten. Tatsächlich deuten aktuelle Studien auf einen vergleichbaren Zusammenhang wie bei der Interaktion zwischen BRCA1 und der Cisplatin-Wirkung hin (Cron et al., 2013; Taron et al., 2004).

4.3 53BP1

Eine hohe 53BP1-mRNA-Expression der Tumorzellen von Patienten mit NSCLC Stadium III scheint im hier untersuchten ESPATÜ-Kollektiv nur bei Plattenepithelkarzinomen, Adenosquamösen und Großzelligen Karzinomen mit einem günstigeren PFS und OS assoziiert zu sein.

Bisher gibt es nur wenige Beschreibungen des Zusammenhanges der 53BP1-Expression mit der Prognose bei Patienten mit NSCLC unter Chemotherapie, mit im Vergleich zu den unseren diskordanten Ergebnissen (Bonanno et al., 2013; Lai et al., 2010). Die unterschiedliche Histopathologie könnte eine Rolle spielen. Lai und seine Kollegen wiesen nach, dass eine erhöhte Expression von 53BP1 bei Adenokarzinomen mit einer Cisplatin-Resistenz und somit ungünstigerem Outcome vergesellschaftet war (Lai et al., 2010). Unsere Daten legen eher einen gegenteiligen Zusammenhang nahe.

4.4 RAP80

Die RAP80-Expression korrelierte hinsichtlich einer möglichen Signifikanz nicht ausreichend mit dem PFS bei den von uns untersuchten Proben von Patienten mit NSCLC Stadium III. Dies

bestätigen die Daten einer niederländischen Arbeitsgruppe, die ebenfalls keinen Einfluss beider Parameter bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC unter Therapie mit Cisplatin und Gemcitabin nachweisen konnte (Joerger et al., 2011).

4.5 RAP80- und BRCA1-Expression

Wir testeten in der hier vorgelegten Arbeit, ob die Kombination von zwei Genen eine signifikantere Trennschärfe hinsichtlich der Überlebensparameter aufweist, als die jeweiligen Gene alleine. Patienten, bei denen sowohl die Expression von RAP80 als auch BRCA1 eine Erhöhung aufwies, zeigten ein signifikant längeres PFS als jene, die beide Gene niedrig exprimierten. Die Befunde waren noch deutlicher bei der alleinigen Betrachtung der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen, Adenosquamösen und Großzelligen Karzinomen (Ausschluss der Adenokarzinome). Darüber hinaus konnten wir in dieser Subgruppe der Nicht-Adenokarzinome eine signifikant günstigere Gesamtüberlebenszeit für die Patienten mit demselben Genexpressionsprofil (hohe Expressionen für BRCA1 und RAP80) zeigen.

Bonanno und Kollegen kamen 2013 in einer retrospektiven Studie zu diskordanten Ergebnissen: In einer Gruppe von 83 Patienten mit fortgeschrittenen Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen, die eine Chemotherapie bestehend aus Cis- oder Carboplatin und Gemcitabin oder Pemetrexed erhielten, untersuchten sie die mRNA-Expression beider Gene mittels RT-PCR in Tumorgewebe. Patienten, die beide Gene hoch exprimierten, hatten deutlich kürzere mediane Gesamt- und Progressions-freie Überlebenszeiten als solche, die sie niedrig exprimierten (Bonanno et al., 2013). Da auch in dieser klinischen Studie die Patienten nur Platin-basierte Chemotherapie erhielten und kein Mitosehemmstoff als Kombinationspartner eingesetzt wurde, muss auf die oben beschriebene Interaktion zwischen der BRCA1-Expression und der Prognose unter Taxanen bzw. Vinka-Alkaloiden hingewiesen werden (James et al., 2007; Mullan et al., 2006). Hierin könnte der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen.

Eine prospektiv randomisierte Biomarker-geleitete Phase III Studie der Spanish Lung Cancer Group verwendete ebenfalls die Expressionsprofile von BRCA1 und RAP80. Diese Studie verglich eine Kombinationstherapie aus Docetaxel und Cisplatin im Standardarm mit individuell angepasster Therapie im experimentellen Arm gemäß der BRCA1- und RAP80-Expression (Moran et al., 2014). Die Patienten erhielten bei niedriger RAP80-Expression unabhängig von der Höhe der BRCA1-Expression Gemcitabine und Cisplatin. Bei einer mittleren bis hohen RAP80-Expression und einer niedrigen bis mittleren BRCA1-Expression, wurde Docetaxel- und Cisplatin-basiert behandelt. Im

Fälle einer mittleren bis hohen RAP80-Expression und einer hohen BRCA1-Expression wurde eine Monotherapie mit Docetaxel durchgeführt. Die endgültigen Daten zeigten ein signifikant ungünstigeres Outcome in der experimentellen Therapiegruppe, deren Chemotherapie an die individuellen Expressionsniveaus beider Gene angepasst worden war (Moran et al., 2014). Somit konnte hier kein prospektiver Vorteil einer Messung der beiden Gene validiert werden. Es bleibt jedoch zu klären ob die Ursache eine grundlegend falsche Einschätzung der Zusammenhänge von Gen-Expression und jeweiliger Substanzklasse war oder ob mögliche Fehlerquellen nicht ausreichend berücksichtigt wurden.

4.6 53BP1- und BRCA1-Expression

Bei niedriger mRNA-Expression von BRCA1 und 53BP1 wiesen die Patienten signifikant kürzere OS und PFS auf, als wenn sie beide Gene hoch exprimierten.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass es eine höhere Aussagekraft haben könnte, wenn zwei Gene (in diesem Falle 53BP1 und BRCA1) gemessen werden, als wenn ein Gen alleine für die Prädiktion des Therapieerfolges herangezogen wird. Bonanno und ihre Kollegen untersuchten ebenfalls den prädiktiven Wert dieser Gene bei Patienten mit einem Lungenkarzinom. Sie bestimmten bei 115 Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und platinbasierter Chemotherapie (Gemcitabin oder Pemetrexed als jeweiliger Partner) das mRNA-Expressionsniveau von BRCA1 und 53BP1. Sie fanden heraus, dass die Patienten mit einer in Relation zum untersuchten Gesamtkollektiv niedrigeren BRCA1- und 53BP1-Expression länger lebten (OS=19,3 Monate) und ein günstigeres PFS (10,3 Monate) aufwiesen. Wurde BRCA1 niedrig und 53BP1 hoch exprimiert waren die Überlebenszeiten signifikant kürzer (Bonanno et al., 2013). Wie oben bereits kommentiert, erhielten die Patienten dieser Studie in der Erstlinienbehandlung kein Taxan bzw. Vinka-Alkaloid. Dies könnte zu einem Teil für die diskrepanten Daten im Vergleich zu unserer Untersuchung verantwortlich sein, und somit für die vermutete Dominanz der Mitosehemmstoffe gegenüber Platin in Bezug auf die Auswirkungen der DNA-Reparaturgene sprechen (James et al., 2007; Mullan et al., 2006).

Zusammenfassend scheinen Mitosehemmstoffe eine im Vergleich zu Platinderivaten unterschiedliche Korrelation zu den untersuchten DNA-Reparaturgenen zu haben: Im Falle einer Platintherapie wiesen Patienten mit hohen BRCA1- und 53BP1-Expressionen eine schlechtere Prognose auf, während unter einer zusätzlichen Taxan oder Vinka-Alkaloid Behandlung ein besseres therapeutisches Outcome erreicht wurde.

4.7 ESPATÜ-Patienten versus Gesamtgruppe

Die Patienten der ESPATÜ-Studie stellen bezüglich ihrer Eigenschaften und der durchgeführten Therapieprotokolle eine insgesamt homogenere Patientengruppe dar (siehe Abbildung 16, Seite 39). Die Analyse in der gesamten Patientengruppe aller 100 Patienten mit Stadium III NSCLC bezieht sich damit auf eine heterogenere Population, was interessanterweise zu einer höheren Auftrennung zwischen den einzelnen Genexpressionsgruppen führte. Dies gilt beispielsweise für den Zusammenhang zwischen BRCA1-Expression alleine und gemeinsam mit der RAP80-Expression sowohl in Bezug zum PFS, als auch zum OS. Zwischen den einzelnen histologischen Subgruppen kann in der Gesamtgruppe ebenfalls eine größere Auftrennung in der BRCA1-Expression festgestellt werden. Dies könnte an der höheren Stichprobenzahl der Gesamtgruppe liegen. Um diese bisher erhobenen Ergebnisse weiter abzusichern und die Biomarker als prognostisch oder prädiktiv zu bestätigen, bedürfe es allerdings einer Validierung der Befunde in weiteren unabhängigen, prospektiv geplanten Untersuchungen.

4.8 Methodenkritik

4.8.1 Ungenauigkeiten von Genexpressionsanalysen

BRCA1, RAP80, 53BP1 erfüllen Teilfunktionen komplexer Reaktionskaskaden in der DNA-Reparatur (Bekker-Jensen et al., 2010; Strauss et al., 2011), sie sind jedoch nicht die einzigen beteiligten Gene an diesem Prozess (Strauss et al., 2011). Es ist zu vermuten, dass der Ausfall beispielsweise von BRCA1 durch alternative Reparaturmechanismen ganz oder zum Teil kompensiert werden kann (Daley et al., 2014; Strauss et al., 2011). Der Zusammenhang der Expression der hier untersuchten Gene und deren Implikationen im Verhalten einzelner Tumorzellen oder gar eines Tumorzellverbundes unter systemischer Therapie können durch andere Gene, die hier nicht untersucht wurden, beeinflusst worden sein. Erschwert werden die Analysen solcher DNA-Reparaturmechanismen zusätzlich durch unterschiedliche Behandlungsstrategien wie zytostatische Chemotherapie einerseits und Strahlentherapie andererseits, die jeweils ungleiche Wirkungsmechanismen aufweisen (Vokes et al., 1990). Hierdurch wird die Aussagekraft der Untersuchungen zur Identifizierung von Prognosemarkern basierend auf der Messung der Expression einzelner Gene der DNA-Reparatur eingeschränkt. Eine Etablierung von verlässlichen Markern könnte jedoch dabei helfen, die Heilungsraten der Patienten durch Manipulation bestimmter DNA-Reparatur-Schritte weiter zu verbessern. So kommt es zum Beispiel durch Einsatz von Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1)-Inhibitoren zu

effektiver Zytotoxizität in BRCA1- und BRCA2-defizienten Ovarialkarzinomen (Bryant et al., 2005; Sessa, 2011). Es ist vorstellbar, dass durch die zunehmende Verfügbarkeit von Sequenzierung und Microarray-Untersuchungen Zusammenhänge aufgedeckt werden können, die eine Erklärung für die benannten Diskrepanzen liefern.

4.8.2 mRNA-Expression versus Protein-Expression

Basierend auf co- und posttranskriptionalen Veränderungen können aus einem prä-mRNA-Molekül verschiedene reife mRNA-Moleküle und daraus mehrere unterschiedliche Proteine mit gegebenenfalls unterschiedlichen Funktionen entstehen. Somit kann das mRNA-Expressionsprofil durchaus unterschiedliche Ausprägungsmuster im Vergleich zum Protein-Expressionsprofil aufweisen. Dies ist für die Gene BRCA1, RAP80 und 53BP1 in der Literatur beschrieben. So gibt es zum Beispiel für BRCA1 mindestens 30 verschiedene Splicing Varianten, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden (Orban et al., 2003). Das Genprodukt von RAP80 kann sich in verschiedenen Isoformen präsentieren (Shebzukhov et al., 2007), durch alternatives Splicing kann 53BP1 differente Funktionen ausüben (Iwabuchi et al., 2008). Es scheint aber generell ein enger Bezug der mRNA-Expression von Zielgenen zu der resultierenden Proteintranslation zu existieren. Neue Daten zeigen, dass bestimmte Gen-Varianten auf RNA-Ebene eine signifikante Beziehung zum Ansprechen auf die Therapie haben können, unabhängig von der Messung der resultierenden Proteine (Antonarakis et al., 2014).

5 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Untersuchung zur Messung der Expression von Genen der DNA-Reparatur und deren möglichen prognostischen Bedeutung für die multimodale Behandlung von Patienten mit lokal-fortgeschrittenen Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen konnten wir anhand von mRNA-Expressionsprofilen von BRCA1, RAP80 und 53BP1 sowie gezielter Kombination dieser Marker untereinander eine signifikante Aufteilung eines prospektiv, relativ homogen behandelten Patientenkollektivs vornehmen.

Analysiert wurde prätherapeutisches Biopsiematerial im Wesentlichen aus mediastinalen Lymphknotenmetastasen und in seltenen Fällen aus Primärtumorgewebe. Als wichtigste Befunde ergaben sich Zusammenhänge 1) zwischen der mRNA-Expression von BRCA1 und der histologischen Subgruppe, dem progressionfreien Überleben („progression-free survival“, PFS) und dem Gesamtüberleben („overall survival“, OS), 2) zwischen der mRNA-Expression von 53BP1 und dem PFS sowie dem OS bei den Nicht-Adenokarzinompatienten, 3) zwischen der kombinierten Messung von BRCA1 und RAP80 und dem PFS in der Gesamtgruppe sowie dem OS bei den Nicht-Adenokarzinompatienten, und 4) zwischen der gemeinsamen Messung von BRCA1 und 53BP1 und dem PFS sowie OS bei allen eingeschlossenen Patienten.

Bei der klinischen Bewertung der Zusammenhänge zwischen der Expressionshöhe dieser DNA-Reparaturgene und der Prognose der Patienten muss die Komplexität der multimodalen Behandlung mittels Induktionschemotherapie aus Cisplatin und Paclitaxel, einer simultanen Chemostrahlentherapie basierend auf Cisplatin und Vinorelbin mit oder ohne definitive Operation berücksichtigt werden.

Um zu überprüfen, ob diese Marker tatsächlich zur Therapiesteuerung und -individualisierung genutzt werden können, ist eine Integration in zukünftige prospektive Studien erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Albain, K. S., Crowley, J. J., LeBlanc, M., Livingston, R. B. (1991). Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer: the Southwest Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 9, 1618-1626.
2. Albain, K. S., Swann, R. S., Rusch, V. W., Turrisi, A. T., 3rd, Shepherd, F. A., Smith, C., Chen, Y., Livingston, R. B., Feins, R. H., Gandara, D. R., Fry, W. A., Darling, G., Johnson, D. H., Green, M. R., Miller, R. C., Ley, J., Sause, W. T., Cox, J. D. (2009). Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet* 374, 379-386.
3. Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Luber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., Chen, Y., Mohammad, T. A., Chen, Y., Fedor, H. L., Lotan, T. L., Zheng, Q., De Marzo, A. M., Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., Eisenberger, M. A., Luo, J. (2014). AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 371, 1028-1038.
4. Auperin, A., Le Pechoux, C., Rolland, E., Curran, W. J., Furuse, K., Fournel, P., Belderbos, J., Clamon, G., Ulutin, H. C., Paulus, R., Yamanaka, T., Bozonnet, M. C., Uitterhoeve, A., Wang, X., Stewart, L., Arriagada, R., Burdett, S., Pignon, J. P. (2010). Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28, 2181-2190.
5. Bekker-Jensen, S., Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 9, 1219-1228.
6. Boffetta, P., Mannetje, A., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Rudnai, P., Lissowska, J., Fabianova, E., Mates, D., Bencko, V., Navratilova, M., Janout, V., Cardis, E., Fevotte, J., Fletcher, T., Brennan, P. (2005). Occupational X-ray examinations and lung cancer risk. *Int J Cancer* 115, 263-267.
7. Bonanno, L., Costa, C., Majem, M., Favaretto, A., Rugge, M., Rosell, R. (2013). The predictive value of BRCA1 and RAP80 mRNA expression in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Ann Oncol* 24, 1130-1132.
8. Bonanno, L., Costa, C., Majem, M., Sanchez, J. J., Gimenez-Capitan, A., Rodriguez, I., Vergnenegre, A., Massuti, B., Favaretto, A., Rugge, M., Pallares, C., Taron, M., Rosell, R. (2013). The predictive value of 53BP1 and BRCA1 mRNA expression in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. *Oncotarget* 4, 1572-1581.
9. Bonanno, L., Favaretto, A., Rosell, R. (2014). Platinum drugs and DNA repair mechanisms in lung cancer. *Anticancer Res* 34, 493-501.

10. Boukovinas, I., Papadaki, C., Mendez, P., Taron, M., Mavroudis, D., Koutsopoulos, A., Sanchez-Ronco, M., Sanchez, J. J., Trypaki, M., Staphopoulos, E., Georgoulas, V., Rosell, R., Souglakos, J. (2008). Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 3, e3695.
11. Brenner, D. R., Boffetta, P., Duell, E. J., Bickeboller, H., Rosenberger, A., McCormack, V., Muscat, J. E., Yang, P., Wichmann, H. E., Brueske-Hohlfeld, I., Schwartz, A. G., Cote, M. L., Tjonneland, A., Friis, S., Le Marchand, L., Zhang, Z. F., Morgenstern, H., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Zaridze, D., Rudnai, P., Fabianova, E., Foretova, L., Janout, V., Bencko, V., Schejbalova, M., Brennan, P., Mates, I. N., Lazarus, P., Field, J. K., Raji, O., McLaughlin, J. R., Liu, G., Wiencke, J., Neri, M., Ugolini, D., Andrew, A. S., Lan, Q., Hu, W., Orlow, I., Park, B. J., Hung, R. J. (2012). Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am J Epidemiol* 176, 573-585.
12. Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.
13. Bugreev, D. V., Hanaoka, F., Mazin, A. V. (2007). Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat Struct Mol Biol* 14, 746-753.
14. Bunting, S. F., Callen, E., Wong, N., Chen, H. T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C. X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J. M., Nussenzweig, A. (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243-254.
15. Burns, D. M., Anderson, C. M., Gray, N. (2011). Has the lung cancer risk from smoking increased over the last fifty years? *Cancer Causes Control* 22, 389-397.
16. Ceballos, S. J., Heyer, W. D. (2011). Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochim Biophys Acta* 1809, 509-523.
17. Ceppi, P., Papotti, M., Scagliotti, G. (2010). New strategies for targeting the therapy of NSCLC: the role of ERCC1 and TS. *Adv Med Sci* 55, 22-25.
18. Chabaliere, C., Lamare, C., Racca, C., Privat, M., Valette, A., Larminat, F. (2006). BRCA1 downregulation leads to premature inactivation of spindle checkpoint and confers paclitaxel resistance. *Cell Cycle* 5, 1001-1007.
19. Coleman, K. A., Greenberg, R. A. (2011). The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. *J Biol Chem* 286, 13669-13680.

20. Costa, C., Molina, M. A., Drozdowskyj, A., Gimenez-Capitan, A., Bertran-Alamillo, J., Karachaliou, N., Gervais, R., Massuti, B., Wei, J., Moran, T., Majem, M., Felip, E., Carcereny, E., Garcia-Campelo, R., Viteri, S., Taron, M., Ono, M., Giannikopoulos, P., Bivona, T., Rosell, R. (2014). The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EORTC trial. *Clin Cancer Res* 20, 2001-2010.

21. Cox, D. (1972). Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society B* 34, 187 - 220.

22. Cron, K. R., Zhu, K., Kushwaha, D. S., Hsieh, G., Merzon, D., Rameseder, J., Chen, C. C., D'Andrea, A. D., Kozono, D. (2013). Proteasome inhibitors block DNA repair and radiosensitize non-small cell lung cancer. *PLoS One* 8, e73710.

23. Curran, W. J., Jr., Paulus, R., Langer, C. J., Komaki, R., Lee, J. S., Hauser, S., Movsas, B., Wasserman, T., Rosenthal, S. A., Gore, E., Machtay, M., Sause, W., Cox, J. D. (2011). Sequential vs. concurrent chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer: randomized phase III trial RTOG 9410. *J Natl Cancer Inst* 103, 1452-1460.

24. Daley, J. M., Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 34, 1380-1388.

25. Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J. M., Baysson, H., Bochicchio, F., Deo, H., Falk, R., Forastiere, F., Hakama, M., Heid, I., Kreienbrock, L., Kreuzer, M., Lagarde, F., Makelainen, I., Muirhead, C., Oberaigner, W., Pershagen, G., Ruano-Ravina, A., Ruosteenoja, E., Rosario, A. S., Tirmarche, M., Tomasek, L., Whitley, E., Wichmann, H. E., Doll, R. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 330, 223.

26. De Ligio, J. T., Velkova, A., Zorio, D. A., Monteiro, A. N. (2009). Can the status of the breast and ovarian cancer susceptibility gene 1 product (BRCA1) predict response to taxane-based cancer therapy? *Anticancer Agents Med Chem* 9, 543-549.

27. Eberhardt, W., Wilke, H., Stamatidis, G., Stuschke, M., Harstrick, A., Menker, H., Krause, B., Mueller, M. R., Stahl, M., Fläschke, M., Budach, V., Gresschuchna, D., Konietzko, N., Sack, H., Seeber, S. (1998). Preoperative chemotherapy followed by concurrent chemoradiation therapy based on hyperfractionated accelerated radiotherapy and definitive surgery in locally advanced non-small-cell lung cancer: mature results of a phase II trial. *J Clin Oncol* 16, 622-634.

28. Eberhardt, W. E., De Ruysscher, D., Weder, W., Le Pechoux, C., De Leyn, P., Hoffmann, H., Westeel, V., Stahel, R., Felip, E., Peters, S. (2015). 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*

29. Eberhardt, W. E., Gauler, T. C., Lepechoux, C., Stamatidis, G., Bildat, S., Krbek, T., Welter, S., Grunenwald, D., Fischer, B., Rodrigo Hde, L., Theegarten, D., Le Chevalier, T., Seeber, S., Stuschke, M., Poettgen, C. (2013). 10-year long-term survival (LTS) of induction chemotherapy

with three cycles cisplatin/paclitaxel followed by concurrent chemoradiation
cisplatin/etoposide/45 Gy (1.5 Gy bid) plus surgery in locally advanced non-small-cell lung
cancer (NSCLC)-a multicenter phase-II trial (CISTAXOL). *Lung Cancer* 82, 83-89.

30. Eberhardt, W. E., Pottgen, C., Gauler, T. C., Friedel, G., Veit, S., Heinrich, V., Welter, S., Budach, W., Spengler, W., Kimmich, M., Fischer, B., Schmidberger, H., De Ruysscher, D., Belka, C., Cordes, S., Hepp, R., Lutke-Brintrup, D., Lehmann, N., Schuler, M., Jockel, K. H., Stamatis, G., Stuschke, M. (2015). Phase III Study of Surgery Versus Definitive Concurrent Chemoradiotherapy Boost in Patients With Resectable Stage IIIA(N2) and Selected IIIB Non-Small-Cell Lung Cancer After Induction Chemotherapy and Concurrent Chemoradiotherapy (ESPA-TUE). *J Clin Oncol*
31. Gautschi, O., Mack, P., Gandara, D., Rosell, R. im Pass, H.I., Carbone, D.P., Johnson, D.H., Minna, J.D., Scagliotti, G.V., Turrisi, A.T. (2010): Principles & Practice of Lung Cancer: The Official Reference Text of the IASLC (4). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
32. Gazdar, A., Robinson, L., Oliver, D., Xing, C., Travis, W. D., Soh, J., Toyooka, S., Watumull, L., Xie, Y., Kernstine, K., Schiller, J. H. (2014). Hereditary lung cancer syndrome targets never smokers with germline EGFR gene T790M mutations. *J Thorac Oncol* 9, 456-463.
33. Goeckenjan, G., Sitter, H., Thomas, M., Branscheid, D., Flentje, M., Griesinger, F., Niederle, N., Stuschke, M., Blum, T., Deppermann, K.-M., Eicker, J.H., Freitag, L., Lübke, A.S., Reinhold, T., Späth-Schwalbe, E., Ukena, D., Wickert, M., Wolf, M., Andreas, S., Auberger, T., Baum, R.P. et al. (2010). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. Retrieved 15.01.2015, from http://www.medical-tribune.de/uploads/media/S3-Leitlinie_Lungenkarzinom_2010.pdf
34. Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D. J., Groome, P. A., Rami-Porta, R., Postmus, P. E., Rusch, V., Sobin, L., International Association for the Study of Lung Cancer International Staging, C., Participating, I. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2, 706-714.
35. Guzzo, C. M., Berndsen, C. E., Zhu, J., Gupta, V., Datta, A., Greenberg, R. A., Wolberger, C., Matunis, M. J. (2012). RNF4-dependent hybrid SUMO-ubiquitin chains are signals for RAP80 and thereby mediate the recruitment of BRCA1 to sites of DNA damage. *Sci Signal* 5, ra88.
36. Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., Loomis, D. (2014). Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 122, 906-911.
37. Hartman, A. R., Ford, J. M. (2002). BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32, 180-184.

38. Hoffmann, A. C., Danenberg, K. D., Taubert, H., Danenberg, P. V., Wuerl, P. (2009). A three-gene signature for outcome in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 15, 5191-5198.
39. Hoffmann, A. C., Mori, R., Vallbohmer, D., Brabender, J., Klein, E., Drebber, U., Baldus, S. E., Cooc, J., Azuma, M., Metzger, R., Hoelscher, A. H., Danenberg, K. D., Prenzel, K. L., Danenberg, P. V. (2008). High expression of HIF1a is a predictor of clinical outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA, VEGF, and bFGF. *Neoplasia* 10, 674-679.
40. Hu, Y., Scully, R., Sobhian, B., Xie, A., Shestakova, E., Livingston, D. M. (2011). RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci. *Genes Dev* 25, 685-700.
41. Husain, A., He, G., Venkatraman, E. S., Spriggs, D. R. (1998). BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 58, 1120-1123.
42. Hüsing, B., Hartig, J., Bührle, B., Reiß, T., Gaisser, S. (2008). Individualisierte Medizin und Gesundheitssystem. Berlin: Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag (TAB).
43. IARC, International Agency for Research on Cancer (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 83, 1-1438. Retrieved 12.12.2015, from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/mono83.pdf>
44. Islami, F., Torre, L. A., Jemal, A. (2015). Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Transl Lung Cancer Res* 4, 327-338.
45. Iwabuchi, K., Matsui, T., Hashimoto, M., Matsumoto, Y., Kurihara, T., Date, T. (2008). Characterization of a cancer cell line that expresses a splicing variant form of 53BP1: separation of checkpoint and repair functions in 53BP1. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 509-513.
46. James, C. R., Quinn, J. E., Mullan, P. B., Johnston, P. G., Harkin, D. P. (2007). BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *Oncologist* 12, 142-150.
47. Joerger, M., deJong, D., Burylo, A., Burgers, J. A., Baas, P., Huitema, A. D., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. (2011). Tubulin, BRCA1, ERCC1, Abraxas, RAP80 mRNA expression, p53/p21 immunohistochemistry and clinical outcome in patients with advanced non small-cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy. *Lung Cancer* 74, 310-317.
48. Kaatsch, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Cernaj, J., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Kriehoff-Henning, E., Kunz, B., Penzkofer, A., Treml, K., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Franke, M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U. (2013): Krebs in

Deutschland 2009/2010 (9). Berlin: Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Retrieved 12.12.2015, from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs_node.html;jsessionid=2AAE39C982C75BC46F1EB71FDDE263E2.2_cid390

49. Kakarougkas, A., Jeggo, P. A. (2014). DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol* 87, 20130685.
50. Kaplan, E. L., Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer. Statist. Assn.* 53(282), 457-481.
51. Karachaliou, N., Costa, C., Gimenez-Capitan, A., Molina-Vila, M. A., Bertran-Alamillo, J., Mayo, C., Massuti, B., Majem, M., Carcereny, E., Moran, T., Sanchez, J. J., Viteri, S., Gasco, A., Wannesson, L., Souglakos, J., Jimeno, J., Rosell, R., Spanish Lung Cancer, G. (2013). BRCA1, LMO4, and CtIP mRNA expression in erlotinib-treated non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *J Thorac Oncol* 8, 295-300.
52. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573-584.
53. Köhler, J., Schuler, M. (2013). Afatinib, erlotinib and gefitinib in the first-line therapy of EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma: a review. *Onkologie* 36, 510-518.
54. Lai, T. C., Chow, K. C., Lin, T. Y., Chiang, I. P., Fang, H. Y., Chen, C. Y., Ho, S. P. (2010). Expression of 53BP1 as a cisplatin-resistant marker in patients with lung adenocarcinomas. *Oncol Rep* 24, 321-328.
55. Lam, T. K., Gallicchio, L., Lindsley, K., Shiels, M., Hammond, E., Tao, X. G., Chen, L., Robinson, K. A., Caulfield, L. E., Herman, J. G., Guallar, E., Alberg, A. J. (2009). Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 184-195.
56. Liang, J. G., Jin, Z. Y., Gao, X. D., Te, M. R., Ge, L. H., Wang, C. L. (2014). Predictive role of RRM1 and BRCA1 mRNA expression on the clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* 13, 5292-5298.
57. Masters, G. im Pass, H.I., Carbone, D.P., Johnson, D.H., Minna, J.D., Scagliotti, G.V., Turrisi, A.T. (2010): Principles & Practice of Lung Cancer: The Official Reference Text of the IASLC (4). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
58. Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y., Yang, J. J., Chewaskulyong, B., Jiang, H., Duffield, E. L., Watkins, C. L., Armour, A. A., Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361, 947-957.

59. Morales-Espinosa, D., Garcia-Roman, S., Karachaliou, N., Rosell, R. (2015). Pharmacogenomics in the treatment of lung cancer: an update. *Pharmacogenomics* 16, 1751-1760.
60. Moran, T., Wei, J., Cobo, M., Qian, X., Domine, M., Zou, Z., Bover, I., Wang, L., Provencio, M., Yu, L., Chaib, I., You, C., Massuti, B., Song, Y., Vergnenegre, A., Lu, H., Lopez-Vivanco, G., Hu, W., Robinet, G., Yan, J., Insa, A., Xu, X., Majem, M., Chen, X., de Las Penas, R., Karachaliou, N., Sala, M. A., Wu, Q., Isla, D., Zhou, Y., Baize, N., Zhang, F., Garde, J., Germonpre, P., Rauh, S., H, A. L., Sanchez-Ronco, M., Drozdowskyj, A., Sanchez, J. J., Camps, C., Liu, B., Rosell, R., Spanish Lung Cancer, G., French Lung Cancer, G., Comprehensive Cancer Centre of Drum Tower Hospital in, N. (2014). Two biomarker-directed randomized trials in European and Chinese patients with nonsmall-cell lung cancer: the BRCA1-RAP80 Expression Customization (BREC) studies. *Ann Oncol* 25, 2147-2155.
61. Mullan, P. B., Gorski, J. J., Harkin, D. P. (2006). BRCA1--a good predictive marker of drug sensitivity in breast cancer treatment? *Biochim Biophys Acta* 1766, 205-216.
62. Nel, I., Gauler, T. C., Eberhardt, W. E., Nickel, A. C., Schuler, M., Thomale, J., Hoffmann, A. C. (2013). Formation and repair kinetics of Pt-(GpG) DNA adducts in extracted circulating tumour cells and response to platinum treatment. *Br J Cancer* 109, 1223-1229.
63. Neuhouwer, M. L., Patterson, R. E., Thornquist, M. D., Omenn, G. S., King, I. B., Goodman, G. E. (2003). Fruits and vegetables are associated with lower lung cancer risk only in the placebo arm of the beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 350-358.
64. Noll, D. M., Mason, T. M., Miller, P. S. (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* 106, 277-301.
65. Oken, M. M., Creech, R. H., Tormey, D. C., Horton, J., Davis, T. E., McFadden, E. T., Carbone, P. P. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5, 649-655.
66. Oliver, T. G., Mercer, K. L., Sayles, L. C., Burke, J. R., Mendus, D., Lovejoy, K. S., Cheng, M. H., Subramanian, A., Mu, D., Powers, S., Crowley, D., Bronson, R. T., Whittaker, C. A., Bhutkar, A., Lippard, S. J., Golub, T., Thomale, J., Jacks, T., Sweet-Cordero, E. A. (2010). Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev* 24, 837-852.
67. Orban, T. I., Olah, E. (2003). Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol Pathol* 56, 191-197.
68. Panier, S., Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 7-18.

69. Papadaki, C., Tsaroucha, E., Kaklamanis, L., Lagoudaki, E., Trypaki, M., Tryfonidis, K., Mavroudis, D., Stathopoulos, E., Georgoulas, V., Souglakos, J. (2011). Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 104, 316-323.
70. Pierceall, W. E., Olaussen, K. A., Rousseau, V., Brambilla, E., Sprott, K. M., Andre, F., Pignon, J. P., Le Chevalier, T., Pirker, R., Jiang, C., Filipits, M., Chen, Y., Kutok, J. L., Weaver, D. T., Ward, B. E., Soria, J. C. (2012). Cisplatin benefit is predicted by immunohistochemical analysis of DNA repair proteins in squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma: theranostic modeling by NSCLC constituent histological subclasses. *Ann Oncol* 23, 2245-2252.
71. Pöttgen, C., Eberhardt, W., Graupner, B., Theegarten, D., Gauler, T., Freitag, L., Abu Jawad, J., Wohlschlaeger, J., Welter, S., Stamatis, G., Stuschke, M. (2013). Accelerated hyperfractionated radiotherapy within trimodality therapy concepts for stage IIIA/B non-small cell lung cancer: Markedly higher rate of pathologic complete remissions than with conventional fractionation. *Eur J Cancer* 49, 2107-2115.
72. Quinn, J. E., Kennedy, R. D., Mullan, P. B., Gilmore, P. M., Carty, M., Johnston, P. G., Harkin, D. P. (2003). BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 63, 6221-6228.
73. Robinson, L. A., Ruckdeschel, J. C., Wagner, H., Jr., Stevens, C. W., American College of Chest, P. (2007). Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132, 243S-265S.
74. Rosell, R., Crino, L., Danenberg, K., Scagliotti, G., Bepler, G., Taron, M., Alberola, V., Provencio, M., Camps, C., De Marinis, F., Sanchez, J. J., Penas, R. (2003). Targeted therapy in combination with gemcitabine in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 30, 19-25.
75. Rosell, R., Molina, M. A., Costa, C., Simonetti, S., Gimenez-Capitan, A., Bertran-Alamillo, J., Mayo, C., Moran, T., Mendez, P., Cardenal, F., Isla, D., Provencio, M., Cobo, M., Insa, A., Garcia-Campelo, R., Reguart, N., Majem, M., Viteri, S., Carcereny, E., Porta, R., Massuti, B., Queralt, C., de Aguirre, I., Sanchez, J. M., Sanchez-Ronco, M., Mate, J. L., Ariza, A., Benlloch, S., Sanchez, J. J., Bivona, T. G., Sawyers, C. L., Taron, M. (2011). Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 17, 1160-1168.
76. Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108.
77. Schottenfeld, D. im Pass, H.I., Carbone, D.P., Johnson, D.H., Minna, J.D., Scagliotti, G.V., Turrisi, A.T. (2010): Principles & Practice of Lung Cancer: The Official Reference Text of the IASLC (4). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

78. Schrump, D., Carter, D., Kelsey, C., Marks, L., Giaccone, G. im DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A. (2011): Cancer Principles & Practice of Oncology (9). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
79. Sessa, C. (2011). Update on PARP1 inhibitors in ovarian cancer. *Ann Oncol* 22 Suppl 8, viii72-viii76.
80. Shebzukhov, Y. V., Koroleva, E. P., Khlgatian, S. V., Belousov, P. V., Sazykin, A. Y., Kadachigova, T. S., Pomerantseva, E. A., Lagarkova, M. A., Nedospasov, S. A., Kuprash, D. V. (2007). RAP80/UIMC1 as cancer-associated antigen: alternative splice variants and their immunogenicity. *Cancer Lett* 255, 255-262.
81. Shi, L., Oberdoerffer, P. (2012). Chromatin dynamics in DNA double-strand break repair. *Biochim Biophys Acta* 1819, 811-819.
82. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 10-29.
83. Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D. R., Culhane, A. C., Moreau, L. A., Xia, B., Livingston, D. M., Greenberg, R. A. (2007). RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* 316, 1198-1202.
84. Stanley, K. E. (1980). Prognostic factors for survival in patients with inoperable lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 65, 25-32.
85. Strauss, C., Goldberg, M. (2011). Recruitment of proteins to DNA double-strand breaks: MDC1 directly recruits RAP80. *Cell Cycle* 10, 2850-2857.
86. Sudo, T., Nitta, M., Saya, H., Ueno, N. T. (2004). Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res* 64, 2502-2508.
87. Sy, S. M., Huen, M. S., Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7155-7160.
88. Tardon, A., Lee, W. J., Delgado-Rodriguez, M., Dosemeci, M., Albanes, D., Hoover, R., Blair, A. (2005). Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* 16, 389-397.
89. Taron, M., Rosell, R., Felip, E., Mendez, P., Souglakos, J., Ronco, M. S., Queralt, C., Majo, J., Sanchez, J. M., Sanchez, J. J., Maestre, J. (2004). BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 13, 2443-2449.
90. Therasse, P., Arbuck, S. G., Eisenhauer, E. A., Wanders, J., Kaplan, R. S., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, A. T., Christian, M. C., Gwyther, S. G. (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for

Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92, 205-216.

91. Tiseo, M., Bordi, P., Bortesi, B., Boni, L., Boni, C., Baldini, E., Grossi, F., Recchia, F., Zanelli, F., Fontanini, G., Naldi, N., Campanini, N., Azzoni, C., Bordi, C., Ardizzoni, A., Bio, F. t. g. (2013). ERCC1/BRCA1 expression and gene polymorphisms as prognostic and predictive factors in advanced NSCLC treated with or without cisplatin. *Br J Cancer* 108, 1695-1703.
92. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87-108.
93. Travis, W. D. (2011). Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 32, 669-692.
94. Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22, 5612-5621.
95. Vignard, J., Mirey, G., Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol* 108, 362-369.
96. Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R. (1990). Concomitant chemoradiotherapy: rationale and clinical experience in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 8, 911-934.
97. Wachters, F. M., Wong, L. S., Timens, W., Kampinga, H. H., Groen, H. J. (2005). ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy. *Lung Cancer* 50, 211-219.
98. Wichmann, H. E. (2007). Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol* 19 Suppl 1, 241-244.
99. Yu, X., Jacobs, S. A., West, S. C., Ogawa, T., Egelman, E. H. (2001). Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8419-8424.
100. Zhao, H., Zhang, H., Du, Y., Gu, X. (2014). Prognostic significance of BRCA1, ERCC1, RRM1, and RRM2 in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy. *Tumour Biol* 35, 12679-12688.

Anhang

Weitere Ergebnisse

1: BRCA1: signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen T-Stadien (primäre Tumorausbreitung).

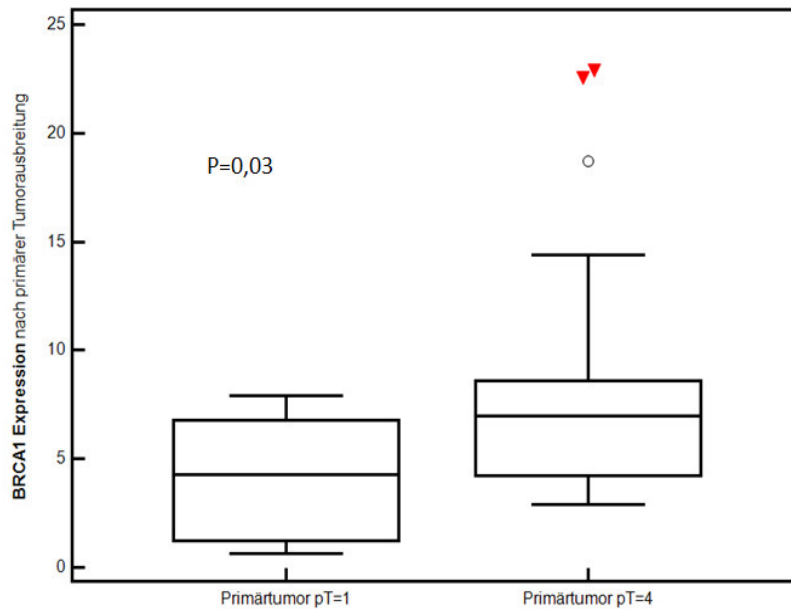


Abbildung 42: BRCA1-Expression bei T1- und T4-Stadium. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tumorausbreitungs-Stadien.

2: 53BP1: Kein Unterschied zwischen den verschiedenen histologischen Tumorentitäten.

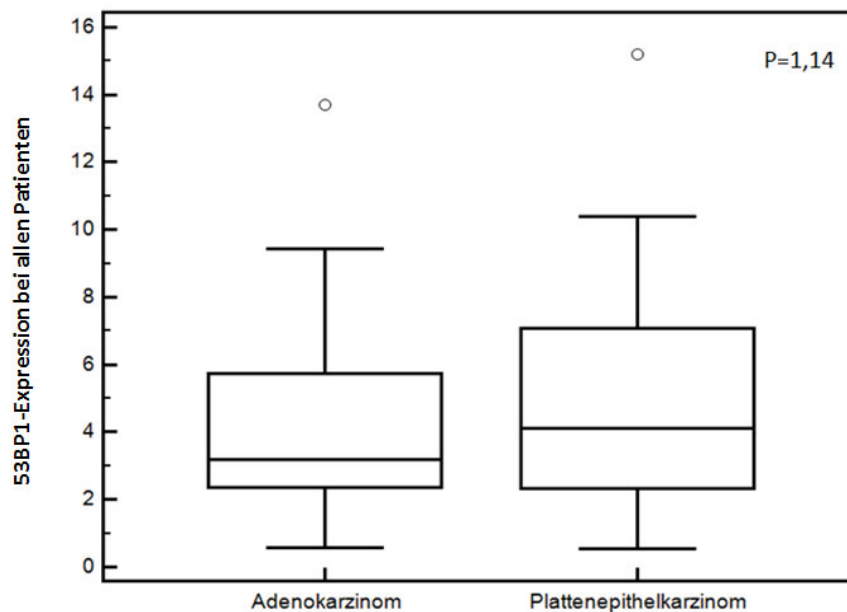


Abbildung 43: 53BP1-Expression bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Histologie-Typen.

3: RAP80: Kein Unterschied zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen

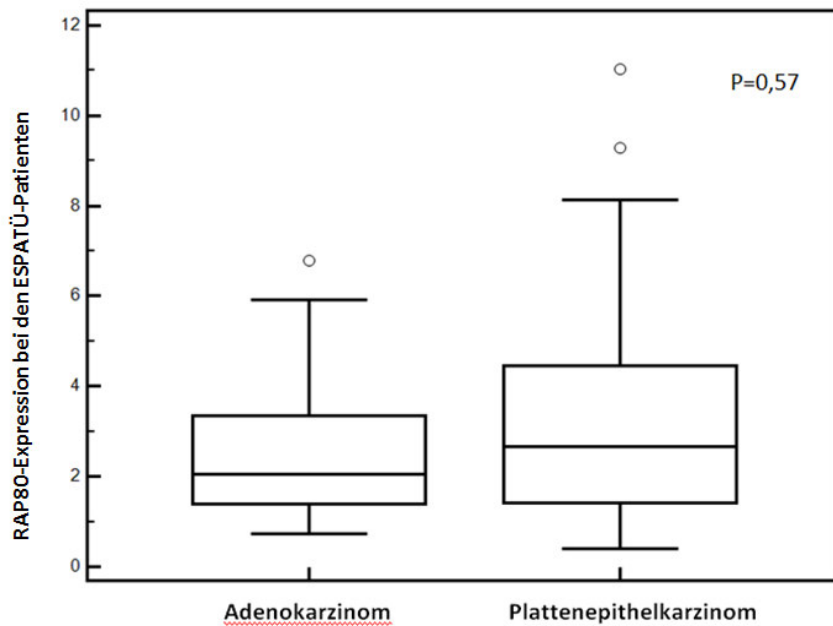


Abbildung 44: RAP80-Expression bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der ESPATÜ-Studienpatienten . Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Histologien.

Abkürzungsverzeichnis

53BP1: tumor protein p53 binding protein 1

ASCO: American Society of Clinical Oncology

ATP: Adenosintriphosphat

BRCA1: E3 Ubiquitin Ligase Breast Cancer 1

cDNA: complementary DNA

CR: Komplettes Ansprechen, „complete response“

CRP: C-reaktives Protein

CT: Computertomographie

Ct: Cycle threshold

CTV: Klinisches Zielvolumen, „clinical target volume“

DDR: DNA damage response

DLco: Diffusing capacity or Transfer factor of the lung for carbon monoxide

DNA: Desoxyribonukleotidsäure

DNTP's: Desoxyribonukleosidtriphosphate

DSB: Doppelstrangbrüche, „double-strand breaks“

DTT: Dithiothreitol

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EKG: Elektrokardiogramm

EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer

FEV1: Forciertes expiratorisches Volumen, expiratorische Einsekundenkapazität

FFPE: Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettet

G-CSF: Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

HE-Färbung: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HR: Homologe Rekombination

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

ICRU: International Commission on Radiation Units & Measurements

IRIF: ionizing radiation-induced foci

LDH: Laktatdehydrogenase

M-MLV RT: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase-Enzym

MRN: MRE11-RAD50-NBS1-Komplex

mRNA: messenger Ribonukleinsäure

MRT: Magnetresonanztomographie

NC: Keine Vergrößerung des längsten Tumordurchmessers, „no change“, „stable disease“

NER: Nukleotidexzisionsreparatur

NHEJ: nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung, „nonhomologous end-joining“

NOS: not otherwise specified

NSCLC: Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom, „non-small cell lung cancer“

NTC: Kontrolle ohne Probe, „No Templet Control“

NYHA: New York Heart Association (Klassifikation der Herzinsuffizienz)

OS: Gesamtüberleben, „overall survival“

PARP1-Inhibitoren: Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 Inhibitoren

PD: progressive disease

PET-CT: Positronenemissionstomographie mit Computertomographie

PFS: Progressionfreies Überleben, „progression-free survival“

PR: Partielle Remission bzw. Ansprechen, „partial response“

PS: performance status

PTV: Geplantes Zielvolumen, „planning target volume“

RAP80 (UIMC1): Ubiquitin-Interaktions-Motiv enthaltenden Receptor Associated Protein 80

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

rpm: rounds per minute

RT-PCR: Polymerase-Kettenreaktion, „real time polymerase chain reaction“

SCLC: Kleinzelliges Lungenkarzinom, „small cell lung cancer“

SD: Standardabweichung, „standard deviation“

SDS: Natriumdodecylsulfat, „sodium dodecyl sulfate“

SLCG: Spanish Lung Cancer Group

Taq-Polymerase: Thermus aquaticus Polymerase

TEE: transösophageale Echokardiographie

TE-Puffer: Tris-EDTA-Puffer

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Priv.-Doz. Dr. med. Andreas-Claudius Hoffmann für die große Unterstützung, die Begutachtung und intensive Beratung meiner Dissertation bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei der Hilfestellung bei der Durchführung statistischer Auswertungen, den unzähligen motivierenden Gesprächen und seiner vorzüglichen Betreuung.

Ausdrücklich danke ich Herrn Dr. med. Wilfried Eberhardt für die Möglichkeit und die Realisierung dieser Doktorarbeit. Ohne ihn wäre insbesondere die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Rosell in Barcelona nicht möglich gewesen. Auch ihm gilt mein herzlicher Dank für seine exzellente Beratung und die Korrektur meiner Arbeit.

Es sei der Stiftung „Kampf dem Krebs“ für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes gedankt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Schmid und Prof. Dr. D. Theegarten aus dem Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Essen und Frau Prof. Dr. A. Tannapfel aus dem Institut für Pathologie an der Ruhr-Universität-Bochum für die Kooperation bei der Nutzung der in dieser Arbeit verwendeten Paraffin-eingebetteten Tumorbiopsien.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Rafael Rosell und seiner gesamten Arbeitsgruppe für die Möglichkeit, den experimentellen Teil dieser Arbeit in seinem Labor durchzuführen. Die Kooperation war eine bereichernde Erfahrung und bestätigt meine Auffassung, dass derjenige meist belohnt wird, der Mut hat, innovative Wege im Leben zu gehen. Besonders danke ich Carlota Costa, Niki Karachaliou, Clara Mayo, Susana Benlloch, Zayra Yeste, Erika Aldeguer, Ana Giménez, Miguel Ángel Molina, Jordi Bertrán, Miquel Taron und der Pathologin Dr. Maria Luisa Botero für die große Hilfestellung, die vielen Erklärungen und die wunderbare gemeinsame Zeit.

Weiter danke ich dem Team im Labor von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas-Claudius Hoffmann, insbesondere Dr. Ivonne Nel und Annette Parr für die Einführung in die Laboratoriumsmethoden. Genauso bedanke ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. C. Pöttgen und Frau Ina Grübel an der Klinik für Strahlentherapie am Universitätsklinikum Essen, sowie bei Herrn Ilya Perelmuter und Frau Anja Dreyer für die Hilfsbereitschaft bei der Datenakquise und Aktensuche der in dieser Arbeit untersuchten Patienten.

Ich danke von Herzen meiner Familie und meinen Freunden für die warme, konstante und unersetzbare Begleitung in meiner Studien- und Promotionszeit.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.